

DD/GH
91/06/27
O.nr. 66.316

Styret for det industrielle rettsvern	
Dato	Patentsøknad nr.:
21. AUG 91	911696

Patentsøknad nr. 91.1696

Imperial Chemical Industries PLC,
Millbank, London SW1P 3JF,
GB

Oppfinnere: Roger Camble
Heather Carr
David Timms
Anthony James Wilkinson

Alle med adresse: Alderley Park,
Macclesfield, Cheshire,
GB

"Polypeptider".

Foreliggende oppfinnelse omfatter derivater av granulocyt-koloni-stimulerende faktor (G-CSF) som har en god løsningsstabilitet og fremgangsmåter for deres fremstilling såvel som farmasøytiske blandinger som inneholder disse.

Koloni-stimulerende faktorer er en klasse proteinhormoner som stimulerer delingen og funksjonen til spesifikke typer blodceller slik som granulocytter. Granulocytene opptar og ødelegger infeksiose mikrober og cellerester og representerer således et vitalt forsvar mot infeksjon. I denne sammenheng kan granulocytter utvikle pseudopodier og vandre ut av sirkulasjonen mellom de omgivende endotel-celler. De neutrofile granulocytene kan så komme i direkte kontakt med mikroorganismene og ødelegge dem ved bruk av enestående enzymsystemer slik som dem som lager superperoksyd-anioner. Siden granulocytene har et kort livsløp i sirkulasjonen (ca. 6-12 timer) og blir ødelagt i løpet av deres funksjon, er det nødvendig for stamcellene i benmargen å lage så mange granulocytter som røde blodlegemer hver dag. Videre, er det nødvendig at denne produksjonshastighet av granulocytter kan økes sterkt hvis de behov som infeksjon medfører skal kunne imøtekommes. Som et resultat av deres hurtige omsetning, faller granulocyt-tallet raskt hvis benmargen blir ødelagt f.eks. ved kreft-kjemoterapi, stråling, AIDS eller blodsykdommer, og pasientene blir mottagelige for overveldende infeksjon. Sepsis er i virkeligheten en vanlig dødsårsak hos kreftpasienter hvis marg er undertrykket ved hjelp av ioniserende stråling, kjemoterapi eller deres kreftsykdom.

Granulocyt-koloni-stimulerende faktor (G-CSF) er blitt beskrevet i litteraturen av K. Walle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. vol. 82, s. 1526-1530, og er også blitt beskrevet i Europeisk patentpublikasjon nr. 169.566 og PCT-patentpublikasjon nr. WO 87/01132. G-CSF er blitt vist å stimulere granulocyt-produksjon in vivo og å forårsake minimale bivirkninger. Som resultat blir humant G-CSF antatt å ha mulig anvendelse i behandlingen av neutropeni forbundet med kjemoterapi, strålebehandling, stråleuhell eller autolog benmargtransplantasjon. Videre kan G-CSF muligens få anvendelse i stimulering av benmargundertrykkelse forbundet med AIDS, i behandlingen av

myelodysplastiske syndromer karakterisert ved unormal granulocytt-funksjon og som tillegg i behandlingen av alvorlige infeksjoner.

I tillegg til det ovenfor nevnte er forbindelser av G-CSF beskrevet i PCT-patentpublikasjon nr. WO 87/01132, i europeisk patentpublikasjon nr. 243.153, i europeisk patentpublikasjon nr. 256.843, i europeisk patentpublikasjon nr. 272.703 og i Biochemical and Biophysical Research Communication [1989] vol. 159, nr. 1, s. 103-111, T. Kuga et al. Videre, er forandring av G-CSF og [Ser¹⁷]G-CSF blitt utført ved å erstatte cystein og serin-restene i posisjon 17, men slike forandringer ga ikke den ønskede effekt (Protein Engineering, vol. 3, nr. 4, s. 360 (1990)).

G-CSF og forbindelsene referert til ovenfor synes å lide av ustabilitet i løsning slik at ved henstand har de tendens til å felle ut av løsningen hvilket resulterer i et kort lagringstid og problemer med hensyn til lagring i høye konsentrasjoner. Videre, har G-CSF og visse av forbindelsene referert til ovenfor tendens til kovalent aggregering ved lagring.

Foreliggende oppfinnelse er basert på oppdagelsen av endringer som kan bli gjort til et G-CSF eller en forbindelse av denne som har hele eller deler av aminosyresekvensen og minst én av de biologiske egenskapene til naturlig forekommende G-CSF, f.eks. til naturlig forekommende humant G-CSF, for derved å øke løsningsstabiliteten.

Således tilveiebringes ifølge et trekk av foreliggende oppfinnelse et derivat av naturlig forekommende G-CSF, som har minst én av de biologiske egenskapene til naturlig forekommende G-CSF og en løsningsstabilitet (som herved definert) på minst 35% ved 5 mg/ml, den nevnte forbindelse har minst Cys¹⁷ i den naturlige sekvensen erstattet med en Ser¹⁷-rest, og Asp²⁷ i den naturlige sekvensen er erstattet av en Ser²⁷-rest.

Forbindelsene i den foreliggende oppfinnelse kan gjerne ha minst én videre forandring valgt fra:

- a) Glu¹¹ i den naturlige sekvensen erstattet av en Arg¹¹-rest;
- b) Leu¹⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Glu¹⁵-rest;
- c) Lys²³ i den naturlige sekvensen erstattet av en Arg²³-rest;

- d) Gly²⁶ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala²⁶-rest;
- e) Gly²⁸ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala²⁸-rest;
- f) Ala³⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av en Lys³⁰- eller Arg³⁰-rest;
- g) Lys³⁴ i den naturlige sekvensen erstattet av en Arg³⁴-rest;
- h) Lys⁴⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av en Arg⁴⁰-rest;
- i) Pro⁴⁴ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala⁴⁴-rest;
- j) Leu⁴⁹ i den naturlige sekvensen erstattet av en Lys⁴⁹-rest;
- k) Gly⁵¹ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala⁵¹-rest;
- l) Gly⁵⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala⁵⁵-rest;
- m) Trp⁵⁸ i den naturlige sekvensen erstattet av en Lys⁵⁸-rest;
- n) Pro⁶⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser⁶⁰-rest;
- o) Pro⁶⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser⁶⁵-rest;
- p) Pro¹¹¹ i den naturlige sekvensen erstattet av en Glu¹¹¹-rest;
- q) Thr¹¹⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser¹¹⁵-rest;
- r) Thr¹¹⁶ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser¹¹⁶-rest; og
- s) Tyr¹⁶⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Arg¹⁶⁵-rest.

Forekomsten av minst én videre endring valgt fra (b) til (s) er foretrukket, men forekomsten av minst én ytterligere forandring valgt fra (b), (d), (e), (f), (n) og (o) er spesielt foretrukket, av disse er den videre endring (o) helst foretrukket.

Det er mer å foretrekke at den ytterligere forandring er karakterisert ved minst én av de følgende:

- i) Gln¹¹, Pro^{60,65} i den naturlige sekvensen erstattet av Arg¹¹, Ser^{60,65};
- ii) Ala¹¹¹, Thr^{115,116} i den naturlige sekvensen erstattet av Glu¹¹¹, Ser^{115,116};
- iii) Gln¹¹, Trp⁵⁸, Tyr¹⁶⁵ i den naturlige sekvensen er erstattet av Arg^{11,165}, Lys⁵⁸;
- iv) Leu¹⁵, Gly^{26,28}, Ala³⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av Glu¹⁵, Ala^{26,28}, Lys³⁰; eller

v) Asp²⁷, Pro⁴⁴, Leu⁴⁹, Gly^{51,55}, Trp⁵⁸ i den naturlige sekvensen erstattet av Lys^{49,58}, Ala^{44,51,55}.

Den videre forandring kan også, gjerne være karakterisert av minst én av de følgende:

vi) Leu¹⁵, Gly^{26,28}, Ala³⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av Glu¹⁵, Ala^{26,28}, Arg³⁰;

vii) Pro⁶⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av Ser⁶⁵;

viii) Pro^{60,65} i den naturlige sekvensen erstattet av Ser^{60,65}; eller

ix) Glu¹¹, Pro⁶⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av Arg¹¹, Ser⁶⁵.

De ovenfor definerte forandringer kan således, hvis ønskelig, bli innført i ethvert polypeptid som har minst én av de biologiske egenskapene til naturlig forekommende G-CSF for å forbedre løsningsstabiliteten til molekylet. Modifikasjonene av den foreliggende oppfinnelse kan således bli anvendt på slike polypeptider som varierer i aminosyresekvens fra den som er spesifisert heri for de naturlig forekommende G-CSF med hensyn til identiteten eller lokalisasjonen av én eller flere rester (f.eks. substitusjoner (erstatninger), endestilte og interne tillegg og fjernelser (delesjoner)). Som eksempel kan slike polypeptider omfatte dem som er forkortede, f.eks. ved delesjoner; eller slike som er mer stabile overfor hydrolyse (og, derfor, kan ha forsterkede eller lenger-varende virkninger enn de naturlig forekommende); eller de som er blitt forandret med hensyn til å fjerne ett eller flere mulige seter for O-glykosylering (som kan resultere i høyere aktiviteter for gjærproduserte produkter); eller som har én eller flere cysteinrester fjernet eller erstattet, f.eks. av alanin- eller serin-rester og er potensielt lettere å isolere i aktiv form fra mikrobiologiske systemer; eller som har én eller flere tyrosinrester erstattet av fenylalanin og kan binde mer eller mindre greit til humane G-CSF-reseptorer på målceller. De foreslåtte forandringer (a) til (s), fortrinnsvis (i) til (ix) kan således, f.eks. bli anvendt overfor enten naturlig G-CSF som har Cys¹⁷ i den naturlige sekvensen erstattet av Ser¹⁷ eller overfor allele (nærb slektede) forbindelser og analoger av

disse som er kjent å ha minst én av de biologiske egenskapene til naturlig forekommende G-CSF slik som dem som er beskrevet i publikasjonene henvist til ovenfor.

Polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse som er blitt undersøkt er funnet å ha forbedret løsningsstabilitet sammenlignet med det korresponderende ikke-modifiserte polypeptid mens alle har beholdt en signifikant biologisk aktivitet eller har endog forbedret biologisk aktivitet.

Det vil bli forstått fra det ovenfor nevnte at egenskapen med hensyn til løsningsstabilitet er forskjellig fra oppløselighet. Løsningsstabilitet er en nedsatt tendens hos en substans til å utfelles fra løsning under fysiologiske betingelser med hensyn til pH, temperatur og ione-styrke.

Løsningsstabilitet er målt her ved å bestemme prosentdel av G-CSF-forbindelse som blir igjen i løsning i fosfatbufret saltvann etter 14 dager ved 37°C gitt en opprinnelig konsentrasjon på 1 mg/ml, 5 mg/ml og/eller 10 mg/ml. Måling av løsningsstabilitet er beskrevet i detalj heretter i Referanseeksempel 4. Det er passende at polypeptider ifølge foreliggende oppfinnelse har en løsningsstabilitet ved 5 mg/ml på minst 35%, det er fordelaktig at den er minst 50% og det foretrekkes at den er minst 75%. Det er ønskelig at polypeptidene i foreliggende oppfinnelse skal ha en løsningsstabilitet ved 10 mg/ml på minst 75%, helst minst 85%.

Uttrykket "naturlig forekommende G-CSF" som brukt her refererer seg til de C-CSF som forekommer i naturen og inkluderer de to polypeptidene som har aminosyresekvensen vist i SEQ ID No 37. Disse to polypeptider adskiller seg bare med hensyn til at et tripeptid Val-Ser-Glu er til stede i ett polypeptid mellom posisjonene 35 og 36, men er fraværende i det andre.

Nummereringssystemet som er benyttet gjennom den foreliggende spesifikasjon er basert på det naturlig forekommende polypeptid uten Val-Ser-Glu-innsettingen og betegnelsen "naturlig" som brukt her refererer seg til dette polypeptid uten Val-Ser-Glu-innsettingen. Det vil bli forstått at foreliggende oppfinnelse er anvendbar overfor alle naturlig forekommende former av G-CSF og beslektede forbindelser av denne som beskrevet ovenfor og en hensiktsmessig revisjon av posisjoneringstallene i polypeptidet

kan være nødvendig avhengig av formen til de naturlig forekommende G-CSF, som er valgt ut for forandring.

Ifølge en videre egenskap til den foreliggende oppfinnelse er det vist en DNA-sekvens som koder for hele eller deler av aminosyresekvensen til en forbindelse av naturlig forekommende G-CSF som definert her tidligere. Slike sekvenser kan f.eks. inkludere 1) innsettingen av kodons som er foretrukket for produksjon i utvalgte ikke-pattedyrverter; 2) konstruksjon av kløvningssteder for restriksjonsendonuklease; og/eller 3) lagring av ytterligere start, avslutning eller indre DNA-sekvenser som underletter konstruksjon av greie produksjonsvektorer. DNA-sekvensene i foreliggende oppfinnelse inkluderer dem som er anvendbare for å sikre ekspresjon (produksjon) i prokaryote eller eukaryote vertceller og forbindelsene i den foreliggende oppfinnelse kan være i enten glykosylerte eller ikke-glykosylerte former avhengig av vertcellen som er valgt. Der forbindelsen i den foreliggende oppfinnelse blir oppnådd som ikke-glykosylert form, f.eks. etter produksjon i prokaryote vertceller, kan forbindelsen, hvis ønskelig, bli glykosylert kjemisk f.eks. med pattedyr eller andre eukaryote karbohydrater.

Ifølge en ytterligere egenskap ifølge foreliggende oppfinnelse blir det beskrevet en rekombinant vektor som inneholder en DNA-sekvens som er definert tidligere. Den rekombinante vektor kan f.eks. være et biologisk funksjonelt plasmid eller viral DNA-vektor.

Ifølge en ytterligere side ved foreliggende oppfinnelse blir det beskrevet en fremgangsmåte for å lage en rekombinant vektor som er definert ovenfor som er karakterisert ved innsetting av en DNA-sekvens som tidligere beskrevet i en vektor.

Ifølge en ytterligere side ved foreliggende oppfinnelse er det beskrevet en prokaryot eller eukaryot vertcelle som er transformert stabilt eller transfektert med en rekombinant vektor som definert her tidligere.

Ifølge en ytterligere side ved foreliggende oppfinnelse er det beskrevet en fremgangsmåte for å lage en prokaryot eller eukaryot vertcelle som tidligere definert som er karakterisert ved å transformere eller transfekte en prokaryot eller eukaryot celle med en rekombinant vektor som tidligere definert

for å oppnå en stabil transformert eller transfektert prokaryot eller eukaryot vert.

Ifølge en ytterligere side ved foreliggende oppfinnelse er det beskrevet en fremgangsmåte for å lage en forbindelse av naturlig forekommende G-CSF fra den foreliggende oppfinnelse som er karakterisert ved å dyrke en prokaryot eller eukaryot vertcelle fra oppfinnelsen for å oppnå nevnte forbindelse. Fremgangsmåten vil med fordel også inkludere trinnet for isolering av nevnte forbindelse som er produsert ved hjelp av DNA-sekvensen ifølge oppfinnelsen i den rekombinante vektoren i oppfinnelsen.

Vertcellene som benyttes i fremgangsmåtene til foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis prokaryote slik som *E. coli*, men kan være gjærceller slik som *Saccharomyces cerevisiae* eller pattedyrceller slik som CHO-celler (chinese hamster ovary cells).

Ifølge en videre side ved foreliggende oppfinnelse er det beskrevet en farmasøytisk sammensetning karakterisert ved at den har som aktiv ingrediens minst én forbindelse av naturlig forekommende G-CSF i den foreliggende oppfinnelse forbundet med en farmasøytisk akseptert bærer eller blandingsmiddel.

Ifølge en ytterligere egenskap ved foreliggende oppfinnelse er det beskrevet en fremgangsmåte for å lage hematopoetisk behandling for mennesket som er karakterisert ved å gi en effektiv mengde av en forbindelse fra den foreliggende oppfinnelse.

Ifølge en videre egenskap ved den foreliggende oppfinnelse er det beskrevet en fremgangsmåte for å stoppe delingen av leukemiske celler som er karakterisert ved å gi en effektiv mengde av en forbindelse fra den foreliggende oppfinnelse.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1 viser nukleotidsekvensen til 167 bp-fragmentet som er referert til i eks. 1;

Fig. 2 viser aminosyresekvensen og den korresponderende nukleotidsekvensen til det naturlige (hu) G-CSF og restriksjonssetene;

Fig. 3 viser aminosyresekvensen og den tilsvarende nukleotidsekvensen til [Ser^{17,27}] hu G-CSF og restriksjonsseter;

Fig. 4 viser nukleotidsekvensen til T4 transkripsjons-terminatoren som har (a) terminal SalI og HindIII restriksjonsseter; og (b) terminal SalI og StyI restriksjonsseter;

Fig. 5 viser et restriksjonskart av pTB357 (også referert til her som pLB004);

Fig. 6 viser nukleotidsekvensen til EcoRI-SalI-fragmentet referert til i Referanseeksempel 6(b) men uten interferon α_2 -gensekvensen;

Fig. 7 viser et restriksjonskart av pLB015 (også referert her til som pICI 0080);

Fig. 8 viser et restriksjonskart av pICI 1079;

Fig. 9 viser et restriksjonskart av pICI 54 (også referert her til som pCG54);

Fig. 10 viser et restriksjonskart for pCG61;

Fig. 11 viser et restriksjonskart for pICI 1107 der det skraverte område viser gensekvensen som koder for [Ser^{17,27}] hu G-CSF;

Fig. 12 viser et restriksjonskart for pCG300 (også referert her til som pICI 1295).

Detaljert beskrivelse

Det er fordelaktig hvis forbindelsene i foreliggende oppfinnelse blir valgt å besitte én av de videre forandringer (i), (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii), (viii) eller (ix) som definert tidligere, fortrinnsvis én av de videre forandringene (i), (ii), (iv), (vi), (vii), (viii) eller (ix) og spesielt enten den ytterligere forandring (ii), (iv), (vi), (vii), (viii) eller (ix).

De spesielt foretrukne forbindelser ifølge foreliggende oppfinnelse i kraft av deres gode løsningsegenskap inkluderer

[Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF;

[Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]G-CSF;

[Arg¹¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]G-CSF;

[Arg^{11,23}, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF;

[Arg^{11,34}, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF;
 [Arg^{11,40}, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF;
 [Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF;
 [Arg¹¹, Glu^{15,111}, Ser^{17,27,60,65,115,116}, Ala^{26,28},
 Lys³⁰]G-CSF;
 [Arg^{11,165}, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28}, Lys^{30,58}]-
 G-CSF;
 [Arg¹¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28,44,51,55},
 Lys^{30,49,58}]G-CSF;
 [Arg^{11,165}, Glu^{15,111}, Ser^{17,27,60,65,115,116},
 Ala^{26,28,44,51,55}, Lys^{30,49,58}]G-CSF;
 [Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Arg³⁰]hu G-CSF.

Spesielt foretrukne forbindelser ifølge oppfinnelsen i kraft av deres utmerkede løsningsstabilitet og gode spesifikke aktivitet inkluderer:

- i) [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF,
 - ii) [Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]G-CSF,
 - iii) [Arg¹¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]G-CSF,
 - iv) [Arg^{11,40}, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF,
 - v) [Arg^{11,23}, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF,
 - vi) [Arg^{11,165}, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28},
Lys^{30,58}]hu G-CSF,
 - vii) [Arg¹¹, Glu^{15,111}, Ser^{17,27,60,65,115,116}, Ala^{26,28},
Lys³⁰]hu G-CSF,
 - viii) [Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Arg³⁰]hu G-CSF,
 - ix) [Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF,
 - x) [Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF,
 - xi) [Arg¹¹, Ser^{17,27,65}]hu G-CSF og
 - xii) [Ser^{17,27,65}]hu G-CSF,
- hvor (i), (ii), (iii), (vi), (vii), (viii), (x), (xi) og (xii) er mest å foretrekke.

Disse siste humane G-CSF-forbindelser viser ikke bare utmerkede løsningsstabilitetsegenskaper, men har også forbedret spesifikk aktivitet i forhold til naturlig forekommende human G-CSF.

En metionin først i sekvensen kan være til stede eller fraværende i polypeptidene i den foreliggende oppfinnelse, men det er passende at den er til stede.

Det er funnet å være fordelaktig å benytte en produksjonsvektor basert på pAT153, karakterisert ved:

- i) en promotor og hvis passende en operator til stede, f.eks. en trp-promotor eller en T7A3-promotor. T7A3-promotoren er A3-promotoren til bakteriofag T7 [se J.J. Dunn og F.W. Studier, J. Mol. Biol. 166, 477-535 (1983)]. Den komplette nukleotidsekvensen til bakteriofag T7 DNA og lokaliseringene til T7 genetiske elementer er beskrevet i denne referanse;
- ii) en ribosom bindingssetesekvens, f.eks. en trp leder ribosom bindingssetesekvens;
- iii) kloningssete for genet som skal uttrykkes;
- iv) T4 transkripsjons-termineringssekvens (se SEQ ID nr. 51 og fig. 4);
- v) cer-sekvens (D. Summers et al., MGG, 201, s. 334-338, 1985);
- vi) tetracyklin-repressor-gen (Tet R);
- vii) tetracyklin-resistens-gen (Tet A);
- viii) multiple restriksjonsenzym-gjenkjennelsessekvenser.

SEQ ID nr. 50. viser en sekvens som inkluderer et EcoRI-restriksjons-endonukleasesete (nukleotidene 1-6), A3-promotorsekvensen (nukleotidene 7-52), trp leder ribosom-bindingssetesekvensen (nukleotidene 53-78) og translasjons-startkodon (nukleotidene 79-81).

Det kan være fordelaktig å dyrke verten som er i stand til å uttrykke en forbindelse fra oppfinnelsen i et vekstmedium og tilsette et supplement som inkluderer gjærekstrakt til vekstmediet under dyrkningen. Det er å foretrekke at tilsetning av supplementet som inkluderer gjærekstrakt blir startet på en forhåndsbestemt tid etter dyrkningsstart. Hastigheten og tilsetning av supplementet som omfatter gjærekstrakt er fortrinnsvis slik at vekstmediet ikke blir uttømt for gjærekstrakt. Dette er spesielt fordelaktig hvor produksjonsvektoren er benyttet med en T7A3-promotor.

Det kan også være fordelaktig å dyrke en vert, transformert med en rekombinant vektor som har genetisk materiale som koder for en forbindelse i den foreliggende oppfinnelse, i nærvær av leucin og/eller threonin i en mengde som er tilstrekkelig til å gi øket oppsamling av forbindelsen i foreliggende oppfinnelse. Således er det spesielt fordelaktig å utføre fermenteringen i nærvær av leucin hvor produksjonsvektoren er benyttet med trp-promotoren.

I tillegg til å oppdage forandringene som kan gjøres overfor en G-CSF eller en forbindelse av denne som har hele eller deler av aminosyresekvensen og minst én av de biologiske egenskapene til naturlig forekommende G-CSF, for å øke løsningsstabilitet, er denne oppfinnelse videre basert på oppdagelsen av modifiserte metoder for å rense slike G-CSF og forbindelser av disse.

Således f.eks. er det ingen beskrivelse i PCT-patentpublikasjon nr. WO 87/01132 av fjernelsen av detergent, spesielt N-lauroyl-sarkosin i saltform (f.eks. Sarkosyl) fra G-CSF-forbindelsene laget i denne PCT-publikasjon. Det var derfor nødvendig å identifisere en slik fremgangsmåte for at løsningsstabiliteten til G-CSF-forbindelsen i den foreliggende oppfinnelse kunne bli vurdert ved høy konsentrasjon og for at formuleringsstudier kunne bli utført. I én utførelsesform av oppfinnelsen ble detergensfjerning utført i nærvær av fosfatbufret saltvann (pH 7,2 -7,5). Fosfatbufret saltvann kan passende bli laget fra isotonisk saltvann og kan således f.eks. ha en sammensetning som beskrevet i Eks. 1. I denne henseende var det funnet at andre buffere var mindre anvendbare siden enten detergent-fjernelse, spesielt N-lauroyl-sarkosin- (i saltform) fjernelse, var langsommere eller mer protein ble utfelt. Det er videre å foretrekke å utføre diafiltrasjon, spesielt ved dette stadium, siden det ble funnet å øke effektiviteten uten å føre til øket proteinutfelling. F.eks. diafiltrasjon ble funnet å være å foretrekke fremfor konvensjonell diffusjonsdialyse. Videre ble det funnet at detergent-konsentrasjon, spesielt N-lauroyl-sarkosin i saltform- (f.eks. Sarkosyl) konsentrasjon, kunne bli redusert under 1% mens oppløseligheten under kromatografi ble beholdt. En reduksjon i start-detergent-

konsentrasjon støtter detergentfjernelse og det er således foretrukket å benytte minimumskonsentrasjon av detergent, f.eks. N-lauroyl-sarkosin (i saltform f.eks. Sarkosyl), hvilket er overensstemmende med å beholde oppløseligheten under kromatografi. En spesiell konsentrasjon detergent, f.eks. N-lauroyl-sarkosin (i saltform), f.eks. Sarkosyl, er således fra 0,8 til 0,2%, fortrinnsvis fra 0,5 til 0,2%, særlig omkring 0,3%.

I tillegg til det ovenfor ble det funnet at fjernelsen av detergent slik som N-lauroyl-sarkosin (i saltform), f.eks. Sarkosyl aktiverer spor av proteolytisk aktivitet som kan komplisere produktvurdering. Det ble videre funnet at denne proteolytiske aktivitet kan bli sterkt redusert og endog fjernet hvis, etter detergent-fjernelse ved diafiltrasjon, pH bli redusert til under 7,0 før vesentlig proteolyse, passende ved hjelp av diafiltrering og det er å foretrekke ved hjelp av dialyse. Således i en videre utførelsesform av foreliggende oppfinnelse kan reduksjon eller fjernelse av spormengder proteolytisk aktivitet bli utført ved pH som er under 7,0 men som er tilstrekkelig høy til å unngå vesentlig hydrolyse av polypeptidet. pH kan med fordel bli benyttet i området 6,0-4,5, fortrinnsvis 5,8-5,0 og spesielt rundt 5,4. En videre fordel med denne utførelsesform av oppfinnelsen er at E-coli-forurensninger og/eller degraderte eller ikke-korrekt foldet protein kan bli utfelt ved å benytte denne senkning av pH. Det er å foretrekke at rensning inkluderer et trinn med størrelses-eksklusionskromatografi siden ellers vil problemet med proteolytisk gradering øke og selv om den foreliggende utførelsesform vil redusere slik degradering blir det vanskelig å eliminere den helt.

I tillegg til de ovenfor nevnte fremgangsmåter, vil innføringen av løsningsstabilitet i et G-CSF eller en forbindelse av denne føre til vesentlig forenkling av ekstraksjonsfremgangsmåten. Således ifølge en videre egenskap av foreliggende oppfinnelse blir det beskrevet en fremgangsmåte for å ekstrahere en aktiv forbindelse i oppfinnelsen (som definert tidligere) fra et inklusjonslegeme av denne som er karakterisert ved

- 1) oppløsning av nevnte inklusjonslegeme i en detergent, spesielt N-lauroyl-sarkosin i saltform (f.eks. Sarkosyl),

2) oksydasjon, 3) fjernelse av detergent f.eks. som her tidligere beskrevet og 4) opprettholdelse av løsning etter fjernelse av detergent ved en øket temperatur f.eks. 30-45°C, med fordel 34-42°C og derved muliggjøre utfelling av forurensende bakterielt protein, oligomere produkter og/eller degraderingsprodukter. Den nevnte løsning er passende opprettholdt ved nevnte hevede temperatur i 6-24 timer, med fordel 8-18 timer, helst 10-14 timer og spesielt ca. 12 timer.

Ekstraksjonsfremgangsmåten i foreliggende oppfinnelse kan f.eks. bli utført ved å lysere vertceller etterfulgt av sentrifugering for å oppnå inklusjonslegemet f.eks. i form av en pellet. Inklusjonslegemet kan så bli suspendert i en detergent slik som f.eks. N-laurolyl-sarkosin i saltform (f.eks. Sarkosyl), fortrinnsvis 1-3%, spesielt ca. 2% N-laurolyl-sarkosin i saltform (f.eks. Sarkosyl). Suspensjon i detergent kan bli etterfulgt av oksydasjon, f.eks. i nærvær av koppersulfat (CuSO_4) som i sin tur kan bli fulgt av sentrifugering.

Hvor det er mulig å vaske inklusjonslegemet blir det foretrukket å benytte urea istedenfor f.eks. deoksyholat.

Ekstraksjonsfremgangsmåten i foreliggende oppfinnelse setter en i stand til å forenkle produksjonsfremgangsmåten f.eks. ved å eliminere behovet for bruk av størrelses-eksklusjonskromatografi. Videre det høye utbytte av produkt fra varmebehandlingstrinnet synes å være én av fordelene til den økte løsningsstabilitet av forbindelsene i den foreliggende oppfinnelse. Faktisk jo større løsningsstabilitet desto mer er proteinet tilpasset den nye ekstraksjonsfremgangsmåten. Således f.eks. er å foretrekke at ekstraksjonsfremgangsmåten benyttes for å ekstrahere forbindelser i foreliggende oppfinnelse som har en løsningsstabilitet på minst 85% ved 10 mg/ml. Når den kjente analog $[\text{Met}^{-1}, \text{Ser}^{27}]$ G-CSF ble ekstrahert ved den ovenfor nevnte fremgangsmåte, indikerte rPHPLC at bare 40% av det ønskede produkt forble i løsning etter varmebehandling av en væske som inneholdt 1 mg/ml total-protein. Ved 3 mg/ml total-protein forble bare 19% av forbindelsen i løsning.

Alle nukleotidsekvensene som er referert til her er spesifisert i den konvensjonelle 5' - 3'-betegnelse. Forbindel-

sene i foreliggende oppfinnelse er basert på human G-CSF som også er referert til som hu G-CSF.

Siden forbindelsene laget i eksemplene alle er laget ved bruk av E.coli, vil vanligvis en methionin foran sekvensen være til stede.

De følgende kjemikaliene er det henvist til heretter i Referanseeksemplene og Eksemplene og deres sammensetning er som følger:

Betegnelsen "N-lauroyl-sarkosin" som brukt her refererer til bruken av nevnte forbindelse i saltform. Således i eksemplene blir N-lauroyl-sarkosin benyttet i form av natrium-saltet.

Buffere for restriksjonsenzym

Stabilitet: stabil ved -20°C

Buffersammensetning:

Bufferkomponenter	Endelig konsentrasjon i mmol/l (1:10 fortynnet buffer)				
	A	B	L	M	H
Tris-acetat	33	-	-	-	-
Tris-HCl	-	10	10	10	50
Mg-acetat	10	-	-	-	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10
K-acetat	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
Ditioerytritol (DTE)	-	-	1	1	1
Ditiotreitol (DTT)	0,5	-	-	-	-
2-merkaptoetanol	-	1	-	-	-
pH ved 37°C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

Bufferne ovenfor er tilgjengelige fra Boehringer Mannheim.

I den sete-spesifikke mutagenesefremgangsmåte - Referanse-eksempel 2

Buffer 1 100 mM tris-HCl pH 8,0
 100 mM NaCl
 20 mM MgCl₂

Buffer 2 10 mM tris-HCl pH 8,0
 20 mM NaCl
 1 mM EDTA

Buffer 3 12 mM tris-HCl pH 7,7
 30 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 8 mM 2-merkaptoetanol

Buffer 4 60 mM tris-HCl pH 8,0
 90 mM NaCl
 6 mM MgCl₂
 10 mM DTT

Nukletidmiks 1: 250 µM hver av dATP, dGTP, dCTP=S (fosforotioat-forbindelse av dCTP), dTTP og 1 mM ATP;

Nukleotidmiks 2: 250 µM hver av dATP, dGTP, dCTP, dTTP og 350 µM ATP

M9 minimal-media

Ammoniumklorid	1 g
Dinatriumhydrogen-ortofosfat	6 g
Kalium-dihydrogen-ortofosfat	3 g
Natriumklorid	0,5 g
I destillert vann	1 l.

Supplement/75 ml

300 µl 50% glukose
 75 µl 1M MgSO₄
 75 µl 0,1M CaCl₂
 75 µl 4 mg/ml thiamin
 75 µl 20% kaseinaminosyrer

Sporelementløsning (TES)

TES har følgende sammensetning:

$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1 mg 1^{-1}	100 $\mu\text{g } 1^{-1}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,04 mg 1^{-1}	40 $\mu\text{g } 1^{-1}$
$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg 1^{-1}	10 $\mu\text{g } 1^{-1}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg 1^{-1}	10 $\mu\text{g } 1^{-1}$
H_3BO_3	0,005 mg 1^{-1}	5 $\mu\text{g } 1^{-1}$
KI	0,1 mg 1^{-1}	100 $\mu\text{g } 1^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1 mg 1^{-1}	100 $\mu\text{g } 1^{-1}$
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0045 mg 1^{-1}	4,5 $\mu\text{g } 1^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 mg 1^{-1}	20 $\mu\text{g } 1^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 mg 1^{-1}	20 $\mu\text{g } 1^{-1}$

og blir tilsatt vekstmedia ved 0,5 ml/l.

Geneclean (TM)

Kit inneholder 1) 6M natriumjodid; 2) konsentrert løsning av natriumklorid, Tris og EDTA for å lage natriumklorid/etanol/-vannvask; 3) glassmelk (TM)- et 1,5 ml rør som inneholder 1,25 ml av en blanding av silikamatriks i vann.

Dette er en fremgangsmåte for DNA-rensning basert på metoden til Vogelstein og Gillespie publisert i Proceedings of the National Academy of Sciences USA (1979) vol. 76, s. 615.

Alternativt kan enhver av fremgangsmåtene beskrevet i "Molecular Cloning - a laboratory manual", 2. utg. Sambrook, Fritsch og Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) bli benyttet.

Vilkårlig merknings-kit-produkt fra Pharmacia no. 27-9250

Fremgangsmåten er beskrevet i "Molecular Cloning - a Laboratory Manual", 2. utg. Sambrook, Fritsch og Maniatis, s. 10.13-10.17 (Publisert av Cold Spring Harbor Laboratory 1989).

Sequenase (TM)

Kjemisk modifisert T7 DNA-polymerase

Basert på fremgangsmåten til Tabor og Richardson publisert i "Proceedings of the National Academy of Science USA (1987) vol. 84, s. 4767-4771.

T4 DNA-ligase

Beskrevet i "Molecular Cloning - a Laboratory Manual" 2. utg., Sambrook, Fritsch og Maniatis 5.60-5.64 (publisert av Cold Spring Harbor Laboratory 1989) og også av B. Weiss et al., J. Biol. Chem. vol. 243, s. 4543 (1968).

De følgende ikke-begrensede Eksempler er kun gitt som illustrasjon.

Eksempel 1

Fremstilling av [Ser^{17,27}]hu G-CSF

Fremgangsmåten for trinnene a) og b) i Referanseeks. 1 ble gjentatt med følgende modifikasjoner:

Oligonukleotidene SEQ ID nr. 24, 25, 26 og 27 (som heretter definert) erstatter henholdsvis SEQ ID nr. 1, 2, 3 og 4 (som heretter definert).

c) Kloning av genet for [Ser^{17,27}]hu G-CSF i en ekspressionsvektor.

Genet beskrevet ovenfor (se fig. 3 og SEQ ID nr. 49) ble klonet i plasmidvektor pICI0020. Denne vektor er et pAT153 basert plasmid der 651 bp EcoRI-AccI-regionen er erstattet av et 167 bp EcoRI - ClaI-fragment (SEQ ID nr. 47) som består av:

- (1) syntetisk E.Coli trp-promotor og trp-leder-ribosom-bindingssete,
- (2) translasjons-initieringskodon,
- (3) multiple restriksjonsenzym-gjenkjennelsessekvens som stammer fra M13mp18, som inneholder setene for KpnI, BamHI, XbaI, SalI, PstI, SphI og HindIII,
- (4) syntetisk transkripsjons-termineringssekvens.

DNA-sekvensen fra denne region er vist i fig. 1.

pICI0020-ekspresjonsvektoren ble fordøyet fullstendig med KpnI (BCL) i 10 mM tris-HCl (pH 7,5), 10 mM magnesiumklorid. DNA ble utfelt med etanol ved -20°C fra en løsning som inneholdt 0,3M natriumacetat og så ble de 3'-klebrige endene fjernet ved behandling med T4 DNA-polymerase i 10 min. ved 37°C som følger:

DNA (1 µg) i vann (16 µl)
 10x T4 polymerasebuffer (2 µl)
 0,33M tris-acetat, pH 7,9
 0,1M magnesiumacetat
 0,66M kaliumacetat
 5 mM dithiothreitol
 1 mg/ml bovint serumalbumin (BSA PENTAX fraction V)
 2 mM dNTP-blanding (1 µl)
 T4 DNA-polymerase (1 µl; 2,5 enheter/µl BCL)

Vann (80 µl) ble tilsatt og blandingen ekstrahert med fenol/kloroform (100 µl) og så med kloroform (100 µl). DNA ble utfelt med etanol (250 µl) ved -20°C etter tilsetning av 3M natriumacetat (10 µl), så fordøyet fullstendig med SalI (BCL) i 150 mM NaCl, 10 mM av MgCl₂ og 10 mM tris-HCl (pH 7,5). Vektorbiten mellom Kpn-like-ende til SalI ble renset fra 0,7% agarosegel og isolert ved bruk av Geneclean® etterfulgt av produsentens (Bio101, USA) anbefalte fremgangsmåte.

Det syntetiske gen ble isolert fra pSTP1-vektorer som følger. Vektorene ble fordøyet med ScaI og SalII (begge fra BCL) i 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ og 10 mM tris-HCl (pH 7,5). 530 bp-fragmentet ble renset fra 0,7% agarosegel og isolert ved bruk av Geneclean® etterfulgt av produsentens (Bio101) anbefalte fremgangsmåte.

For ligering ble en blanding av ScaI - SalII-genfragmentet (50 ng) og pICI0020-vektorfragmentet (100 ng) i 20 µl i en løsning som inneholdt 50 mM tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% w/v PEG 8000 og T4 DNA-ligase (2 enheter; BRL) inkubert ved 16°C i 20 timer. Den resulterende blanding ble benyttet for å transformere kompetente E. coli HB101-celler (levert av BRL) som beskrevet herved. Transformanter ble valgt fra vekst på L-agar-skåler som inneholdt 50 µg/ml ampicillin og undersøkt for nærvær av genet ved kolonihybridisering med en

³²P-merket markør (probe) (SEQ ID nr. 24) som beskrevet herved. Plasmid-DNA ble laget fra 6 positivt hybridiserende kolonier, rensset ved sentrifugering i en cesiumklorid-gradient og sekvensen bekreftet ved dideokseysekvensering som beskrevet herved.

Plasmidet som inneholdt dette gen ble betegnet pICI 1080.

d) Subkloning av en ekspresjonskassetten som inneholder et gen for [Ser^{17,27}]G-CSF i M13mp18.

Den følgende subkloning ble utført for å gi et startpunkt for å lage G-CSF-forbindelsene som vist i Eks. 3-8.

Plasmid-DNA fra pICI1080 (renset ved cesiumklorid-tetthet-sentrifugering) ble fordøyet fullstendig med EcoRI og SalI (BCL) ifølge leverandørens instruksjoner. Det lille EcoRI-SalI-fragment som inneholdt trp-promotoren og [Ser^{17,27}]G-CSF-genet ble isolert fra 0,7% agarosegel ved bruk av Geneclean®. Dette fragment ble klonet inn i en EcoRI-SalI-kløvet M13mp18-vektor (DNA levert av Amersham International; enzymer fra BCL). Fragmentene ble bundet sammen i en 5x BRL ligeringsbuffer ved bruk av BRL T4 DNA-ligase (beskrevet tidligere). Ligeringsblandingen ble benyttet til å transfektere kompetent E. coli TG1-celler (gjort kompetente ifølge kalsiumkloridmetoden til Mandel og Higa beskrevet i Molecular Cloning - A Laboratory Manual - Maniatis et al., Cold Spring Harbor). De transfekterte cellene ble suspendert i TY topp-agar som inneholdt 2% X-Gal i DMF og 200 µl logfase E. coli TG1-celler og ble sådd ut på 2x TY-agar-skåler (TY topp-agar - 8 g bactotrypton, 5 g gjærekstrakt, 5 g NaCl, 3,75 g bactoagar i 500 µl sterilt H₂O; TY-skåler - 8 g bactotrypton, 5 g gjærekstrakt, 5 g NaCl, 7,5 g bactoagar i 500 ml steril H₂O). Fire hvite plak ble plukket i 4 x 2 ml 1% E. coli TG1-celler i TY-medium- (8 g bactotrypton, 5 g gjærekstrakt, 5 g NaCl i 500 ml steril H₂O) prøver og dyrket i 6 timer ved 37°C. De 2 ml kulturer ble delt opp i 0,5 ml og 1,5 ml porsjoner. Bakteriene ble sentrifugert ut av løsningen med en Eppendorf®-mikrofuge og supernatantene ble overført i sterile Eppendorf®-rør. 0,5 ml-prøvene ble lagret ved -20°C som fag-løsninger. 1,5 ml-prøvene ble benyttet for å lage enkelt-trådet DNA ved bruk av metoden til Amersham International

M13-sekvenseringshåndbok (se nedenunder). Disse DNA-prøvene ble sekvensert ved bruk av oligonukleotider SEQ 1D nr. 22, SEQ 1D nr. 23 og M13-universal-sekvenseringsprimer. Reaksjonene ble utført ved bruk av Seqvenase kit® ifølge produsentenes instruksjoner. Alle 4 kloner hadde korrekt DNA-sekvens for [Ser^{17,27}]G-CSF.

Stor-skala enkeltkjedet DNA-preparasjon

For enkelt-kjedede DNA-tillagninger på mellom 200-500 µg DNA/ml, ble fremgangsmåten i Amersham International "Oligonukleotide Directed Mutagenesis" benyttet. Fremgangsmåten blir utført i detalj som følger:

STOR-SKALA ENKELTKJEDET DNA-PREP:

A. Tillagning av 1 ml fag-stokk

1. Plukk en enkel TG1 E.coli-koloni fra en glukose/minimal mediumskål. Gro over natt i 10 ml 2 x TY-medium, rysting ved 37°C. Tilsett 10 µl til 20 ml friskt medium, og ryst ved 37°C i 3 timer.
 2. Inokuler 1 ml 2 x TY-medium i et 10 ml sterilt kulturrør med 100 µl av 3 timers kultur fra trinn 1.
 3. Inokuler 1 ml kultur med et rekombinant plaque.
 4. Inkuber i 4 timer med omrysting ved 37°C. Overfør til et mikrosentrifugerør.
 5. Sentrifuger i 5 min. ved romtemperatur. Hell supernatant inn i et nytt rør.
- Lagre over natten ved 4°C. Sett opp en overnattns-kultur ved TG1 E.coli for neste trinn.

B. Vekst av 100 ml fag-kultur.

1. Inokuler 100 ml 2x TY-medium med 1 ml av TG1-overnattns-kultur og ryst ved 37°C til en O.D.₅₀₀ på 0,3.
2. Tilsett 1 ml fag-supernatanten fra A5 (ovenfor) til 100 ml kulturen.
3. Inkuber i 5 timer med omrysting ved 37°C. Overfør til sentrifugerør.

4. Sentrifuger ved 5000 x g i 30 min. ved 4°C.
5. Overfør supernatant til et rent sentrifugerør. Vær omhyggelig og ikke overfør noen celler (behold bakteriebunnfallet for RF DNA-preparasjon).
6. Tilsett 0,2 volumer med 20% w/v PEG 6000 i 2,5M NaCl til supernatanten. Bland godt og la det så stå i 1 time ved 4°C.
7. Sentrifuger ved 5000 x g i 20 min. ved 4°C. Hell av supernatanten.
8. Sentrifuger ved 5000 x g i 5 min., og fjern all gjenværende PEG/NaCl med en uttrukket Pasteur-pipette.
9. Resuspender virus-pelleten i 500 µl vann (dobbeltdestillert) og overfør til et mikrosentrifugerør (1,5 ml).
10. Sentrifuger i 5 min. i en mikrosentrifuge for å fjerne alle gjenværende celler. Overfør supernatanten til et nytt mikrosentrifugerør.
11. Tilsett 200 µl 20% PEG 12,5M NaCl til supernatanten, bland godt og la det så stå ved romtemperatur i 15 min.
12. Sentrifuger i 5 min., hell av supernatanten.
13. Sentrifuger i 2 min. Fjern omhyggelig alle spor av PEG/NaCl med en uttrukket Pasteur-pipette.
14. Resuspender virus-pelleten i 500 µl dobbeltdestillert vann.
15. Tilsett 200 µl fenol mettet med 10 mM tris-HCl pH 8,0. 1 mM EDTA. Vortex kort.
16. La røret stå i 15 min ved romtemperatur.
17. Sentrifuger i 3 min.
18. Overfør supernatanten til et nytt rør.
19. Gjenta trinnene 15-18.
20. Tilsett 500 µl kloroform og ekstraher vannfase to ganger.
21. Tilsett 50 µl 3M natriumacetat og 1 ml absolutt etanol. Bland.
22. Sett dette i tørr-is og etanolbad i 20 min.
23. Sentrifuger i 15 min.
24. Vask hver pellet med 1 ml -20°C etanol. Hell av.
25. Vakuumtørr pellet og løs i 50 µl dobbeltdestillert vann. Denne fremgangsmåte gir 100-200 µg enkelt-kjedet DNA.

e) Fermentering

pICI 1080 ble transformert inn i E. coli stamme MSD 522 og de resulterende rekombinanter renses og vedlikeholdt på glycerol-stamløsninger ved -80°C .

En prøve av kulturen ble fjernet fra stamløsningen og sådd ut på agarskåler med L-ampicillin for å adskille enkelte kolonier etter overnatte-kulturer ved 37°C . En enkelt ønsket koloni ble fjernet og resuspendert i 10 ml L-ampicillin-medium og 100 μl ble umiddelbart sådd ut i hver av ti 250 ml Erlenmeyer-flasker som inneholdt 75 ml L-ampicillin-medium. Etter vekst i 15 timer ved 37°C i en inkubator-ryster ble innholdene i flaskene slått sammen og benyttet til å inokulere en fermentor som inneholdt 20L LCM50 vekstmedium.

Sammensetning av LCM50

	Laget i destillert vann
	g/l
KH_2PO_4	3,0
Na_2HPO_4	6,0
NaCl	0,5
Kasein-hydrolysat (Oxoid L41)	2,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10,00
Gjærekstrakt (Difco)	10,00
Glycerol	35,00
L-leucin	2,5
L-threonin	0,9
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03
Thiamin	0,008
FeSO_4 /sitronsyre	0,94/0,02
Sporelement-løsning (TES)	0,5 ml

Fermenteringen ble utført ved 37°C og pH, kontrollert ved automatisk tilsetning av 6M natriumhydroksyd-løsning, til pH 6,7. Den oppløste oksygentensjon (dOT) settpunkt var 50% luftmetting og ble først kontrollert ved automatisk justering

av fermentorens rørerhastighet. Luftstrøm til fermentoren, først 20L/min., korresponderte til 1 volum pr. volum pr. min. (VVM) ble øket til 50L/min. (2,5 VVM) når fermentorens rørerhastighet nærmet seg 80-90% av maksimum. Siden oksygenoverføringshastigheten (OTR) til fermentorene ikke var i stand til å imøtekomme oksygen-opptakshastigheten (OUR) til bakterien ved en celletetthet større enn det som korresponderte til en OD₅₅₀ på 50 under disse betingelsene, ble dOT i fermentoren ved celletettheter større enn dette vedlikeholdt ved 50% luftmetting ved å begrense bakterienes oksygen-opptakshastighet. Dette ble oppnådd ved å lage mediet til å bli karbon-begrenset ved OD₅₅₀ på 50 og så tilsette en porsjon av den begrensende karbonkilde, sammen med ammoniumsulfat og gjærekstrakt, i en hastighet som begrenset bakterieveksthastigheten.

Fermenteringer ble utført i 16 timer og i løpet av den tiden ble prøver tatt for å måle optisk tetthet (OD₅₅₀), celledørrvekt og oppsamling av G-CSF inn i cellene. G-CSF-opphopning ble målt ved scanning av Coomassie blåfarvede SDS-PAGE-geler av helcellelysater fra bakterieprøven hvilket er velkjent på området.

Når OD₅₅₀ nådde 25, ble kaseinhydrolysat-løsning (100 g/l Oxzoid L41) pumpet inn i fermentorene med en hastighet på 1,5 g/l/time.

Når OD₅₅₀ nådde omtrent 50, ble tilførselen av karbonkilde i fermenteringsbadet tørt hvilket førte til en rask økning i dOT fra 50% luftmetning. Ved dette punkt, ble en tilsetning som inneholdt glycerol (470 g/l), gjærekstrakt (118 g/l) og ammoniumsulfat (118 g/l) pumpet inn i fermentorene i en hastighet som gjenopprettet og så vedlikeholdt dOT ved 50% luftmetning med fermentoromrøring på ca. 80% av maksimum. Etter ca. 13-14 timer ble denne føringstilførsel erstattet med en ny tilførsel som inneholdt bare glycerol (715 g/l) og ammoniumsulfat (143 g/l). Kaseinhydrolysat-tilførselen ble opprettholdt videre ved 1,5 g/l/time. Etter ca. 16 timer, da mikroskopisk undersøkelse av kulturen viste nærværet av store inklusjonslegemer inne i hovedparten av cellene, ble bakteriene høstet med en Sorval RC3B-sentrifuge (7000 g, 30 min., 4°C) og lagret frosset ved -80°C.

f) Opprensning

Frossen cellemasse (500 g) ble resuspendert ved 4°C i 50 mM tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8,0 (5 liter) ved bruk av en Silverston modell AXR-homogenisator. Suspensjonen ble løst opp ved å la den passere tre ganger gjennom en Manton-Gaulin-homogenisator ved 6000 psi og sentrifugert ved 5000xg i 30 min. i en Sorvall RC3C-sentrifuge ved bruk av H6000A-rotor. Supernatanten ble hellet av og pelletfraksjonen lagret ved -20°C før videre opprensning. Pelletfraksjonen (60-100 g) ble tint og resuspendert i 1% w/v deoksykolsyre (natriumsalt) i 5 mM EDTA, 5 mM ditiotritol, 50 mM tris-HCl, pH 9,0 (1200 ml) som inneholdt 1 mg/ml natriumazid ved bruk av en Polytron-homogenisator med en PTA 20-probe ved hastighetsinnstilling 5. Suspensjonen ble blandet i 30 min. ved romtemperatur og sentrifugert ved 6500xg i 30 min. i en Sorvall RC 5C-sentrifuge ved bruk av en GSA-rotor. Supernatanten ble hellet av og pelleten ble gjenvunnet to ganger på samme måte. Pelleten ble så resuspendert to ganger i vann (1 liter) og sentrifugert ved 15.000xg i 20 min. Den endelige pellet som inneholdt vaskede inklusjonslegemer ble løst opp i 2% w/v N-lauroyl-sarkosin-natriumsalt (Sarkosyl) i 50 mM tris-HCl, pH 8,0 (150 ml) som inneholdt 1 mg/ml natriumazid. Koppersulfat ble satt til 20 µM og blandingen rørt i 16 timer ved 20°C før sentrifugering med 30.000xg i 30 min. i en Sorvall RC5C-sentrifuge ved bruk av en SS34-rotor. Supernatanten som inneholdt forbindelsen ble lagret ved -20°C i 50 ml prøver før videre opprensning.

Solubilisert forbindelse (20 ml) ble tint og sendt gjennom et 5 µm filter for å fjerne partikulært materiale. Filtratet ble satt på en kolonne (5 x 90 cm) av Ultrogel Aca54 ekvilibrert med 0,3% w/v N-lauroyl-sarkosin (natriumsalt) i 50 mM tris-HCl, pH 8,0 som inneholdt 1 mg/ml natriumazid ved 4°C. Kolonnen ble eluert med den samme buffer ved en strømhastighet på 2,5 ml/min. og fraksjoner på 10 ml ble samlet. Fraksjoner som inneholdt derivat-proteinet ble slått sammen (ca. 100 ml) og lagret ved 4°C.

Sammenslåtte derivat-inneholdende fraksjoner fra flere kolonner ble kombinert (300-500 µl) og dialysert mot 10 mM

natriumfosfat, 150 mM natriumklorid, pH 7,4 (3-5 liter) som inneholdt 1 mg/ml natriumazid ved bruk av en Amicon CH2A-1S-spiral-patron-diafiltrasjonsapparat utstyrt med en S1Y10-membran (10kD avskjæringspunkt). Det som ble igjen (retentatet) ble sentrifugert ved 30.000xg i 30 min. i en Sorvall RC5C-sentrifuge ved bruk av en SS34-rotor, og supernatanten ble dialysert i en Spectropor 6-8kD-avgrensings-dialyseslange i 40 timer mot tre forandringer (8 liter/300 ml supernatant) av 20 mM natriumacetat, 100 mM natriumklorid, pH 5,4 som inneholdt 1 mg/ml natriumazid. Presipitatet som ble dannet ble fjernet ved sentrifugering 30.000xg i 30 min. og supernatanten dialysert i 24 timer mot vann som inneholdt 1 mg/ml natriumazid etterfulgt av 72 timer mot seks skift av vann. Det endelige retentat ble rensset ved sentrifugering ved 30.000xg i 30 min. og lagret frosset ved -20°C (proteinkonsentrasjon på ca. 1 mg/ml) eller ved 4°C etter frysetørring.

Konsentrasjonen av N-lauroyl-sarkosin (natriumsalt) hadde falt under 0,001% w/v etter diafiltrasjon og var under grensen for påvisning (ca. 0,0001%) til rpHPLC-metoden benyttet etter dialyse mot vann.

Eksempel 2

Fremstilling av [Ser^{17,27}]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 1 ble gjentatt bortsett fra følgende:

Dupleksen I ble fosforylert med T4 polynukleotidkinase og fordøyet med MstII (10 enheter) i 1 x H buffer (BCL; 30 µl) i 2 timer ved 37°C.

Etter presepitering med etanol, ble 143 bp EcoRI-MstII-fragmentet rensset på en 10% polyakrylamidgel som inneholdt 7M urea, isolert ved elektroeluering fra en gel-bit og DNA-kjedene skjøtet sammen som beskrevet i Referanseeksempel 1.

Det syntetiske EcoRI-MstII-fragment som beskrevet ovenfor ble klonet inn i plasmidvektoren pAG88 beskrevet i Referanseeksempel 1. For vektorfremstilling, ble pAG88 (10 µg) fordøyet med MstII (20 enheter; BCL) i 1 x H buffer (BCL; 100 µl) i 2

timer ved 37°C. DNA ble presipitert med etanol fra 0,3M natriumacetat ved -20°C, så fordøyet med EcoRI (20 enheter; BCL) i 1 x H buffer (BCL; 100µl) i 2 timer ved 37°C. Etter presipitering med etanol, ble det store EcoRI-MstII-fragment renset på en 1% agarosegel og renset ved bruk av Geneclean® som beskrevet av produsenten (Bio 101, USA). Kolonier som inneholdt det syntetiske fragment ble bekreftet ved undersøkelse med en radioaktiv probe (markør) laget fra oligonukleotid (SEQ 1D nr. 24) og den korrekte sekvensen bekreftet ved DNA-sekvensering som beskrevet i Referanseeksempel 1. Plasmidet som inneholdt genet for [Ser^{17,27}]G-CSF ble betegnet pICI1107. Genet ble klonet inn i ekspresjonsvektoren pICI0020 og fermentering og proteinrensning ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 3

Fremstilling av [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Referanseeksempel 2 ble gjentatt ved bruk av det mutagene templat M13mpl8 som inneholdt genet for [Ser^{17,27}]G-CSF beskrevet i Eks. 1 eller 2. De mutagene oligonukleotidene som ble benyttet ble betegnet SEQ 1D nr. 28 og SEQ 1D nr. 29 (som definert heretter).

Tripletten ACG i SEQ 1D nr. 28 tjener til å overføre Gln i posisjon 11 til Arg og den første og siste AGA-tripletten i SEQ 1D nr. 29 tjener til å overføre Pro ved posisjonene 65 og 60 til Ser. Mutagenesen ble utført som beskrevet i Referanseeksempel 2 ved bruk av SEQ ID nr. 29 i en enkel "priming" (oligonukleotid)-mutagenese. Dette ga et enkelt plaque som hadde Pro 60 Ser og Pro 65 Ser-forandringene. Enkelt-kjedet DNA ble laget fra dette plaque som beskrevet i Referanseeksempel 2. Dette DNA ble brukt som et mutagent templat i en enkel "primer"-mutagenese ved bruk av SEQ ID nr. 28 som mutagen "primer". Dette ga over 100 plaque, 3 av disse ble undersøkt ved DNA-sekvensering som beskrevet tidligere. Alle 3 hadde alle forandringene til stede. Dobbel-kjedet RF DNA ble laget fra en av plagene ved å følge fremgangsmåten for stor-skala-preparasjon av enkelt-kjedet DNA (trinn d i Eks. 1) til trinn

B5. RF DNA ble ekstrahert fra bakteriebunnfallet ved hjelp av alkali-oppløsningsfremgangsmåten til Birnboim and Doly (Nucleic Acids Research (1979) 7, 1513-1523 og rensset ved cesiumklorid-tetthetsgradient-sentrifugering som beskrevet i "Molecular Cloning - a Laboratory Manual" av Sambrook, Fritsch og Maniatis (Cold Spring Harbor Publication). Det rensede RF DNA ble fordøyet med EcoRI og SalI i buffer H som beskrevet tidligere og den lille fragmentet, som inneholdt trp-promotoren, ribosom-bindingssetet, translasjons-startkodon og genet for [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF isolert fra en 0,7% agarosegel ved bruk av Geneclean®. Fragmentet ble ligert inn i en EcoRI-SalI-fordøyet pICI0020-vektor, ved bruk av 2:1 molart overskudd av innskudd til vektor, med T4 DNA-ligase (BRL) og ligasebuffer, hovedsakelig som beskrevet tidligere. Ligeringsblandingen ble benyttet for å transformere E.Coli-stamme HB101. Transformantene ble valgt ut fra vekst på L-agar-skåler som inneholdt 50 µg/ml ampicillin. Kolonier ble undersøkt for nærværet av det innsatte DNA ved restriksjonsanalyse av plasmid-DNA laget ved fremgangsmåten til Birnboim og Doly som beskrevet i "Molecular Cloning - a Laboratory Manual" Sambrook, Fritsch og Maniatis (Cold Spring Harbor Publication). Plasmid DNA fra en koloni som inneholdt det forventede 619bp EcoRI - SalI-innskudd ble benyttet til å transformere E.coli-stammen MSD522 og betegnet pICI1239. Fermentering og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 4

Fremstilling av [Ser^{17,27,115,116}, Glu¹¹¹]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt ved bruk av det mutagene templat M13mp18 som inneholdt genet for [Ser^{17,27}]-G-CSF beskrevet i Eks. 1 eller 2. Det mutagene oligonukleotid som ble benyttet er betegnet SEQ ID nr. 30 (som heretter definert).

Tripletten GCT tjener til å overføre Thr i posisjon 116 til Ser, tripletten AGA tjener til å overføre Thr i posisjon 115 til Ser og tripletten TTC tjener til å overføre Ala i

posisjon 111 til Glu. Mutagenesefremgangsmåten var hovedsakelig som beskrevet i Eks. 3 og ekspresjonskassetten ble overført til ekspresjonsplasmidet til å gi pICI 1243. Fermentering og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 5

Tillagning av [Arg¹¹, Ser^{17,27}, Lys⁵⁸, Arg¹⁶⁵]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt ved bruk av det mutagene templat M13mp18 som inneholdt genet for [Ser^{17,27}]G-CSF beskrevet i Eks. 1 eller 2. De mutagene oligonukleotidene som ble benyttet er betegnet SEQ ID nr. 28, SEQ ID nr. 31 og SEQ ID nr. 32 (som heretter definert).

Tripletten TTT i SEQ ID nr. 31 tjener til å overføre Trp ved posisjon 58 til Lys og i SEQ ID nr. 32 tjener den andre GCG-tripletten til å overføre Tyr i posisjon 165 til Arg.

Mutagenesefremgangsmåten ble først utført med "dobbel-primer" ved bruk av SEQ ID nr. 31 og SEQ ID nr. 32 som mutagene oligonukleotider som beskrevet i Referanseeksempel 2. Dette ga 2 plaque som begge hadde SEQ ID nr. 32-forandringen (Tyr 165 Arg), men ikke SEQ ID nr. 31-forandringen. Enkelt-kjedet DNA ble laget fra én av disse plaque som beskrevet i Eks. 1. Dette DNA ble benyttet som mutagent templat med en "dobbel-primer"-mutagenes ved bruk av SEQ ID nr. 28 og SEQ ID nr. 31 som mutagene "primere". Dette ga 2 plaque der én hadde alle forandringene og ekspresjonskassetten ble overført til ekspresjonsplasmidet for å gi pICI1246. Fermentering og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 6

Tillagning av [Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]hu G-CSF

a) Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt ved bruk av det mutagene templat M13mp18 som inneholdt genet for [Ser^{17,27}]G-CSF, beskrevet i Eks. 1 eller 2. De mutagene

oligonukleotider som ble benyttet er betegnet SEQ ID nr. 33 og SEQ ID nr. 34 (som herved definert).

Tripletten TTC i SEQ ID nr. 33 tjener til å overføre Leu i posisjon 15 til Glu. I SEQ ID nr. 34 tjener den første TTT-triplett til å overføre Ala i posisjon 30 til Lys og tripletten AGC tjener til å overføre Gly i posisjon 28 og 26 til Ala.

Mutagenesefremgangsmåten var hovedsakelig som beskrevet i Referanseeksempel 2 som et dobbelt "primer"-eksperiment og ekspresjonskassetten overført til ekspresjonsplasmidet til å gi pICI 1266. Fermentering ble utført som beskrevet i Eks. 1.

b) Opprensning

Frossen cellemasse ble løst opp og den urene pellet-fraksjon separert som i Eks. 1. Inklusjonslegemene i pelleten som inneholdt dette protein ble gjort løselig ved deoksykolsyre (natriumsalt) buffer beskrevet i Eks. 1. Den følgende modifiserte fremgangsmåte ble benyttet for dette proteinet.

Urenset pellet-fraksjon (60-100 g) ble tint og resuspendert i 25 mM EDTA, 50 mM tris.HCl, pH 8,0 (1200 ml) ved bruk av Polytron-homogenisator med en PTA 20-probe med hastighetsinnstilling 5. Suspensjonen ble blandet ved romtemperatur i 30 min. og sentrifugert ved 6.500 x g i 30 min. i en Sorvall RC5C-sentrifuge ved bruk av en GSA-rotor. Supernatanten ble hellet av og bunnfallet behandlet to ganger på samme måte. Bunnfallet ble så to ganger resuspendert i vann (1 liter) og sentrifugert som i Eks. 1. Deretter ble rensefremgangsmåten fra Eks. 1 benyttet.

Eksempel 7

Tillagning av [Ser^{17,27}, Lys^{49,58}, Ala^{44,51,55}]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt ved bruk av det mutagene templat M13mp18 som inneholdt genet for [Ser^{17,27}]G-CSF som beskrevet i Eks. 1 eller 2. De mutagene oligonukleotidene som ble benyttet er betegnet SEQ ID nr. 35 og SEQ ID nr. 36 (som heretter definert). I SEQ ID nr. 35 tjener

tripletten AGC til å overføre Gly til Ala i posisjon 51 og Pro til Ala i posisjon 44 og tripletten TTT tjener til å overføre Leu til Lys i posisjon 49. I SEQ ID nr. 36 tjener tripletten TTT til å overføre Trp til Lys i posisjon 58 og den andre AGC-tripletten tjener til å overføre Gly til Aln i posisjon 55. Mutagenesen ble utført som et dobbel-"primer"-eksperiment som beskrevet i Referanseeksempel 2. Dette ga 16 plaq. 8 plaq ble undersøkt ved DNA-sekvensering som beskrevet i Eks. 3. Alle plaq hadde SEQ ID nr. 36-forandringene (Gly55Ala, Trp58Lys) men ingen hadde SEQ ID nr. 35-forandringene. Enkelt-kjedet DNA ble laget fra én av disse plaque som beskrevet i Eks. 1(d) og benyttet som et mutagent templat i en enkelt "primer"-mutagenes ved bruk av SEQ ID nr. 35 som en mutagen primer. Dette ga 50 plaque, 3 av disse ble undersøkt ved DNA-sekvensering, 2 hadde alle forandringene. Ekspresjonskassetten ble overført til ekspresjonsplasmidet til å gi pICI 1297. Fermentering og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 8

Tillagning av [Arg¹¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]hu G-CSF

Frengangsmåten som beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt ved bruk av det mutagene templat M13mp18 som inneholdt genet for [Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Lys³⁰] hu G-CSF som beskrevet i Eks. 6. Det mutagene oligonukleotid som benyttet er betegnet SEQ ID nr. 28 som tjener til å overføre Gln i posisjon 11 til Arg. Det modifiserte genet ble isolert og ligert inn i pICI0020-vektor (Eks. 1). Denne vektor ble benyttet for å transformere E.coli-stamme MSD522 som beskrevet i Eks. 3 og betegnet pICI1347. pICI1347 plasmid DNA ble isolert fra MSD522, rensset ved cesiumklorid-tetthetssentrifugering og fordøyet fullstendig med BamHI og SalI (BCL). Plasmid DNA (5 µg) ble inkubert ved 37°C i 2 timer i BCL høy saltbuffer (100 µl) (50 mM tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂), 100 mM NaCl, 10 mM ditioerytritol) som inneholdt BamHI (40 enheter) og SalI (50 enheter). DNA ble utfelt ved tilsetning av 3M natriumacetat

(10 µl) og absolutt etanol (250 µl) og avkjølt til -20°C i 2 timer, samlet ved sentrifugering (10 min. ved 10.000 opm), tørket i vakuum og løst opp i vann (10 µl). Prøveholdig buffer (2 µl som inneholdt 240 mM tris-acetat, pH 7,8, 6 mM EDTA, 20% sukrose, 0,2% xylencyanol og 0,2% bromfenol blått) ble tilsatt og blandingen påsatt en 0,7% agarose-preparativ gel (i 40 mM tris-acetat (pH 7,8) og 1 mM EDTA) som inneholdt etidiumbromid (0,5 µg/ml) og elektroforese ved 100 volt i 1 time. Det store BamHI - SalI-vektorfragmentet ble isolert fra en 0,7% agarosegel ved bruk av Geneclean®. På lignende måte, ble pIC11239-plasmid-DNA fra Eks. 3 isolert og fordøyet med BamHI og SalI. Det lille BamHI - SalI-fragmentet, som inneholdt Ser-kodoner ved posisjon 60 og 65, ble isolert og bundet til det store BamHI-SalI-vektorfragmentet beskrevet ovenfor. Blandingen ble benyttet til å transformere E. coli-stamme MSD522 og plasmidet betegnet pIC11348. Fermentering og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 6.

Eksempel 9

Fremgangsmåten fra Eks. 1 og 2 ble gjentatt ved bruk av E.coli-stamme Tg1 istedenfor E.coli-stamme MSD 522 i fermenteringstrinnet (se f.eks. Eks. 1(e)).

Eksempel 10

Alternativ ekstraksjonsfremgangsmåte for hu [Met⁻¹, Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]G-CSF

Frossen cellemasse (640 g) ble resuspendert ved 4°C i 50 mM tris-HCl, 5mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 2M urea, pH 8,0 som inneholdt 1 mg/ml natriumazid (5 liter) ved bruk av en Polytron-homogenisator med en PTA20-probe med hastighetsinnstilling 7/8. Suspensjonen ble ødelagt ved å la den gå tre ganger gjennom en Manton-Gaulin Lab 60/60-homogenisator ved 6000 psi og gjennomstrømmet med ytterligere 1 liter buffer. Avkjøling ble utført ved hjelp av en enkel passasje i en Conair-avkjøler ved -20°C. Lysatet ble sentrifugert ved 5000xg

i 30 min. i en Sorvall RC3C-sentrifuge ved bruk av en H6000A-rotor.

Supernatanten ble fjernet og bunnfallet (ca. 450 g) ble resuspendert i den samme buffer (10 l). Suspensjonen ble blandet i 30 min. ved romtemperatur og sentrifugert ved 6000 opm i 30 min. i to Sorvall RC3C-sentrifuger ved bruk av H6000A-rotorer. Supernatanten ble fjernet og bunnfallet gjenvunnet to ganger på samme måte. Bunnfallet ble deretter resuspendert to ganger i vann (10 l) og sentrifugert ved 5000 opm i 30 min. De endelige bunnfallene som inneholdt vaskede inklusjonslegemer ble resuspendert i 2% w/v N-lauroylsarkosin natriumsalt i 50 mM tris HCl, pH 8,0 (1 liter) som inneholdt 1 mg/ml natriumazid ved bruk av en Polytron-homogenisator med hastighetsinnstilling 7. 20 mM kopparsulfat i vann (1,5 ml) ble tilsatt og blandingen omrørt over natten ved romtemperatur før sentrifugering ved 10.000 opm i 30 min. i en Sorvall RC5C-sentrifuge ved bruk av en GSA-rotor.

Supernatanten som inneholdt forbindelsen ble filtrert gjennom et 5 µm filter for å fjerne alle partikler, fortynnet 6 ganger med 50 mM tris HCl, pH 8,0 som inneholdt 1 mg/ml natriumazid ved 4°C, og diafiltrert ved maksimum trykk i et Amicon DC20-ultrafiltreringssystem tilpasset med en S10Y10-patron (10 kd avskjæringspunkt) mot 10 mM natriumfosfat, 150 mM natriumklorid pH 7,4 (90 l) som inneholdt 1 mg/ml natriumazid. Et presipitat dannet seg mot slutten av diafiltreringen.

Det som var igjen (retentatet) (2,2 mg/ml totalt protein, 1,7 mg/ml produkt) ble samlet i 4 liters polypropylenflasker med skruetopp og inkubert over natten ved 37°C. Presipitatet som ble dannet ble fjernet ved sentrifugering ved 5000 opm i 45 min. i en Sorvall RC3C, og supernatanten lagret ved 4°C.

Undersøkelse ved hjelp av SDS-PAGE og rpHPLC, viste at under den siste varmebehandlingen ble forurensende E.coli-proteinet, produktoligomerer og degraderingsprodukter selektivt utfelt, med ca. 85% av det ønskede produktet tilbake i løsning. Den sterkt anrikede oppklarte, varmebehandlede produktløsning var fullt biologisk aktiv og stabil ved 20 mg/ml ved 37°C over 2 uker uten tegn på proteolytisk degradering og mindre enn 20%

utfelling. Dette ga et utmerket mellom-utgangspunkt for videre kromatografisk opprensning.

Eks mpel 11

Karakterisering av G-CSF og forbindelser deriv

En vannløsning av [Met⁻¹, Ser¹⁷]G-CSF og forbindelser deriv (Eks. 1-9) (proteinkonsentrasjon ca. 1 mg/ml) ble konsentrert til minst 11 mg/ml protein i en Amicon YM10-membran ved 4°C. For å hindre utfelling under konsentreringen, ble startløsnings-pH 5,5 først justert til pH 8,5 ved tilsetning av ammoniumhydroksyd til en endelig konsentrasjon på ca. 0,25 mM. Etter konsentrasjon hadde pH i løsningen falt til ca. 8,0.

Den konsentrerte proteinløsning ble justert til 10 mg/ml protein (vurdert fra en 1 mg/ml løsning som gir en A₂₈₀ på 1,0) ved tilsetning av 20 ganger konsentrert fosfatbufret saltvann. Denne 10 mg/ml løsning av forbindelsen i 10 mM natriumfosfat, 150 mM natriumklorid, pH 7,4 (PBS) ga en felles stamløsning fra hvilken ble etablert homogenitet, identitet, biologisk aktivitet og løsningsstabilitet til proteinet.

En stamløsning av hu G-CSF ved 1 mg/ml konsentrasjon i PBS som beskrevet i Referanseeksempel ble også laget.

Hvert protein ble vist å bestå av minst 95% én komponent ved PAGE-SDS-undersøkelse under reduserende og ikke-reduserende betingelser og ved revers fase HPLC. Gjentatt aminosyre-sammensetningsanalyse etter sur hydrolyse i 6NHCl ved 110°C ga aminosyreforhold for hvert derivat, og en nøyaktig måling av proteinkonsentrasjonen i stamløsningen. Denne proteinkonsentrasjon sammen med gjennomsnittet av bioassay-titrene som ble oppnådd på minst 6 forskjellige dager ble benyttet for å bestemme den spesifikke aktiviteten til forbindelsen. N-terminalsekvensanalysen og elektropray-masse-spektrometrisk analyse av utvalgte forbindelser ga de forventede sekvensene og molekylvektene.

Eksempel 12

Tillagning av [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF ved bruk av produksjonsvektor som inneholdt trp-promotor

a) Plasmid pICI1239 (beskrevet i Eks. 3) ble fordøyet med EcoRI og SalI i buffer H som beskrevet tidligere. Det lille EcoRI-SalI-fragmentet som inneholdt trp-promotoren, ribosom-bindingssetet og genet for [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF ble isolert fra en 0,7% agarosegel ved bruk av Geneclean®. Et vektorfragment ble laget fra pICI 0080 (se Referanseeks. 6) ved fordøyelse med EcoRI og XhoI i buffer H og det store EcoRI-XhoI-fragment isolert fra en 0,7% agarosegel ved bruk av Geneclean®. Det lille EcoRI-SalI-fragment ble koblet inn i EcoRI-XhoI-vektorfragmentet, ved bruk av et 2:1 molart overskudd av innskudd til vektor som beskrevet tidligere og ligeringsblandingen benyttet til å transformere E. coli-stammen MSD 522. Transformanter ble selektert for vekst i L-agar-skåler som inneholdt tetracyklin (15 µg/ml). 3 kolonier ble utvalgt og dyrket i M9 minimumsmedium (75 ml) som inneholdt supplement og tetracyklin (15 µg/ml) ved 37°C i 20 timer på en roterende ryster. Proteinproduksjon ble målt ved scanning Coomassie blått-farvede SDS-PAGE-geler fra hel-celle-lysate. Alle 3 kloner uttrykte [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF. Plasmid-DNA fra én av koloniene ble betegnet pICI1327 og sekvensen til promotoren og gen bekreftet ved standard dideoxy-sekvenseringsfremgangsmåter som beskrevet tidligere.

b) Fermentering

pICI1327 ble transformert inn i E. coli-stamme MSD 522 og de resulterende rekombinantene renses og beholdt i glycerol-stamløsning ved -80°C.

En prøve fra kulturen ble fjernet fra stamløsningen og sådd ut på agar-skåler med tetracyklin for å adskille enkeltkolonier etter vekst over natten ved 37°C. En enkelt ønsket koloni ble fjernet og resuspendert i 10 ml tetracyklin-medium og 100 µl ble øyeblikkelig inokulert i hver av tre 250 ml

Erlenmeyer-flasker som inneholdt 75 ml tetracyklin-medium. Etter v kst i 16 timer ved 37°C på en rystemaskin ble innholdene i flaskene slått sammen og benyttet til å inokulere en fermentor som inneholdt 20 l vekstmedium.

Sammensetning av vekstmedium

	Laget i destillert vann g/l
KH ₂ PO ₄	3,0
Na ₂ HPO ₄	6,0
NaCl	0,5
Kaseinhydrolysat (Oxoid L41)	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,00
Gjærekstrakt (Difco)	10,00
Glycerol	35,00
L-leucin	0,625
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,03
Tiamin	0,008
FeSO ₄ /sitronsyre	0,04/0,02
Sporelementløsning (TES)	0,5 ml l ⁻¹
Tetracyklin	10 mg l ⁻¹

Fermenteringen ble så utført ved 37°C, og ved en pH, kontrollert ved automatisk tilsetning av 6M natriumhydroksyd-løsning, til pH 6,7. Det oppløste oksygentensjons (dOT)-settpunkt var 50% luftmetning og ble først kontrollert ved automatisk tilpasning av fermentor-rørerhastigheten. Luftstrøm til fermentoren, først 20L/min., tilsvarende 1 vol. pr. vol. pr. min. (VVM) ble øket til 50 L/min. (2,5 VVM) når fermentor-rørerhastigheten nærmet seg 80-90% av maksimum. Siden oksygen-overføringshastigheten (OTR) til fermentorene ikke var i stand til å møte oksygenopptakshastigheten (OUR) til bakteriene med en celletetthet større enn den som tilsvarte en OD₅₅₀ på 50 under disse forhold, ble dOT i fermentoren ved celletettheter større enn dette vedlikeholdt ved 50% luftmetning ved å begrense bakterienes surstoff-opptakshastighet. Dette ble oppnådd ved å

gjøre mediet slik at det ble karbon-begrensende ved OD₅₅₀ på 50 og så tilsette en føring av den begrensende karbonkilde, sammen med ammoniumsulfat og gjærekstrakt, ved en hastighet som begrenset bakterieveksthastigheten.

Fermenteringer ble utført i 18 timer og i løpet av den tiden ble prøver tatt for å måle optisk tetthet (OD₅₅₀), celletørrvekt og oppsamling av [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF inne i cellene. [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF-produksjon ble målt ved scanning Coomassie-blåfarvede SDS-PAGE-geler av helcellelysat fra bakterieprøver hvilket er velkjent i feltet.

Når OD₅₅₀ nådde 35 (8,5 timer), ble kaseinhydrolysatløsning (100 g/l Oxzoid L41) pumpet inn i fermentorene med en hastighet på 0,75 g/l/time.

Når OD₅₅₀ nådde ca. 50, ble forsyningen av karbonkilde i fermentorprøven utbrukt hvilket førte til en rask stigning i dOT fra 50% luftmetning. Ved dette punkt, ble en tilførsel som inneholdt glycerol (470 g/l), gjærekstrakt (118 g/l) og ammoniumsulfat (118 g/l) pumpet inn i fermentorene med en hastighet som gjenvant og så vedlikeholdt dOT ved 50% luftmetning med fermentoromrøring ved ca. 70-80% av maksimum. Kaseinhydrolysat-tilførsel ble opprettholdt ved 0,75 g/l/time gjennom det hele. Etter omtrent 18 timer, da mikroskopisk undersøkelse av kulturen viste nærvær av store inklusjonslegemer inne i mesteparten av cellene, ble bakteriene høstet på en Sorval RC3B-sentrifuge (7000 g, 30 min., 4°C) og lagret frosset ved -80°C.

c) Opprensning

Opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 1(f).

Eksempel 13

Tillagning av [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF ved bruk av produksjonsvektor som inkluderte T7A3-promotor

a) Et EcoRI-SalI-fragment som inneholdt en T7A3-promotor, en trp-leder-ribosom-bindingssesekvens og et gen for

[Ser^{17,27}]hu G-CSF ble sub-klonet i M13 mp18 som beskrevet i del d) i Eks. 1. Sekvensen til EcoRI-SalI-fragmentet er vist i SEQ ID nr. 50 og fig. 3, SEQ ID nr. 50 består av EcoRI-restriksjonssetet (nukleotidene 1-6), A3-promotorsekvensen til bakteriofag T7 (nukleotidene 7-52), trp-leder-ribosom-bindingssetesekvensen (nukleotidene 53-58) og translasjonsstartkodon (nukleotidene 79-81). Fig. 3 viser nukleotidsekvensen til [Ser^{17,27}]hu G-CSF som stopper i SalI-restriksjonssetet. Det vil bli forstått at 3'-terminal ATG-kodon til SEQ ID nr. 50 kommer like foran ACT-kodon som koder for threonin (aminosyre 1) i fig. 3. 5'-nukleotidsekvensen AATTCAGT er således fraværende fra EcoRI-SalI-fragmentet. EcoRI-SalI-fragmentet kan også bli laget ved å skjære fra pICI 1295 (se Referanseeksempel 7). Sete-direkte mutagenese ble utført på enkelt-kjedet DNA som beskrevet i Referanseeksempel 2 ved bruk av nukleotid SEQ ID nr. 28 til å overføre kodon for Gln i posisjon 11 til Arg. Dobbel-kjedet RF DNA ble laget fra et plaque som inneholdt Gln¹¹ til Arg¹¹-forandringen som beskrevet i Eks. 3, bortsett fra at trinn B3-inkubasjonen var 3 istedenfor 5 timer, og fordøyelse med EcoRI (som beskrevet tidligere) og SnaBI (som beskrevet i Referanseeksempel 5). Det resulterende 144 bp EcoRI-SnaBI-fragmentet som inneholdt T7A3-promoter, trp-leder-ribosom-bindingssetesekvensen og gen-fragment med Arg¹¹-kodon ble isolert og ligert til en EcoRI-SnaBI kuttet vektor fra pICI 1327 (som inneholder kodoner for Ser⁶⁰ og Ser⁶⁵ og beskrevet i Eks. 2). Ligeringsblandingen ble benyttet for å transformere E. coli-stamme MSD522 og transformanter valgt for vekst på L-agarskåler som inneholdt tetracyklin (15 µg/mg). Plasmid DNA fra en koloni som inneholdt den forventede T7A3-promotor og [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF-gensekvensen ble identifisert ved sekvensering av DNA fra det isolerte plasmidet og betegnet pICI 1386.

Fermenteringen ble utført ifølge to alternative fremgangsmåter (b) og (c) nedenunder. Fremgangsmåte (b) ble utført ved 37°C og etter 16 timers fermentering som beskrevet, mikrobiologisk biomasse var 35 g/l og [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF ble vurdert å bli produsert til 7 g/l fermenteringsmedium. Fremgangsmåte (c) ble utført ved 30°C og fermenteringen ble

følgelig langsommere på grunn av den lavere fermenterings-temperaturen. Med hensyn til fremgangsmåte (c), ble etter 35 timer, den mikrobiologiske biomasse 55 g/l og [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF-utbytte vurdert å være totalt 15 g/l fermenteringsmedium.

b) E. coli-stamme CGSC 6300 (genotype F⁻, λ⁻, lac⁺) oppnådd fra E. coli Genetic Stock Centre ble transformert med plasmid pICI 1386. Den resulterende stamme CGSC 6300 (pICI) ble rensset og bevart i glycerol-stamløsning ved -80°C. En prøve av kulturen ble fjernet fra stamløsningen og sådd ut på agarskåler med L-tetracyklin for å adskille enkeltkolonier etter overnattvekst (16 timer) ved 37°C.

En enkel koloni av CGSC 6300 (pICI 1386) ble fjernet og resuspendert i 100 ml L-tetracyklinmedium og 100 µl ble øyeblikkelig inokulert i hver av tjue 250 ml Erlenmeyer-flasker som inneholdt 75 ml L-tetracyklinmedium. Etter vekst i 16 timer ved 37°C på en rystemaskin ble innholdene i flaskene slått sammen, og benyttet til å inokulere et ferment som inneholdt 20 liter med modifisert LCM50-vekstmedium. Sammensetningen av vekstmediet er i Tabell 1.

Tabell 1: Sammensetning av vekstmedium

Modifisert LCM50-vekstmedium (A)

	Laget i destillert vann g/l
KH ₂ PO ₄	3,0
Na ₂ HPO ₄	6,0
NaCl	0,5
Kaseinhydrolysat (Oxoid L41)	2,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,0
Gjærekstrakt (Difco)	20,0
Glycerol	35,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,03
Tiamin	0,008
FeSO ₄ /sitronsyre	0,04/0,02
Sporelementløsning (TES)	(0,5 ml l ⁻¹)
Tetracyklin	(10 mg l ⁻¹)

Fermenteringen ble så utført ved 37°C og ved pH, som var kontrollert ved automatisk tilsetning av 6M natriumhydroksyd-løsning, til pH 6,7. Den oppløste oksygentensjons (dOT) settpunkt var 50% luftmetning og ble opprinnelig kontrollert ved automatisk justering av fermentor-rørerhastigheten. Luftstrøm til fermentoren var først 20 L/min. hvilket korresponderte til 1,0 vol/vol/min. (VVM) og ble øket til 45 L/min. manuelt når fermentor-rørerhastigheten nådde maksimum (1000 opm). Fermenteringen ble utført i 16 timer og i løpet av den tiden ble prøver tatt for måling av optisk tetthet i kulturen (OD₅₅₀) biomassekonsentrasjon, total mikrobiologisk proteinkonsentrasjon og ansamling av [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF inne i bakteriecellene. Ansamlingen ble målt ved scanning Coomassie-blå-farvede SDS-PAGE-geler av hel-celle-lysate av bakterieprøvene hvilket er velkjent på området. Totalt mikrobiologisk protein ble vurdert ved metoden til Lowry. En løsning av gjærekstrakt (225 g/l) ble pumpet inn i fermentoren 4,5 timer etter inokulering av 1,7 g/l/time.

Når forsyningen av karbonkilde (glycerol) i vekstmediet ble uttømt øket dOT raskt fra 50% luftmetning. Ved dette punkt ble en tilførsel som inneholdt glycerol (714 g/l) ammoniumsulfat (143 g/l) pumpet inn. Siden den bakterielle oksygensulfathastighet (OUR) nærmet seg maksimum surstoff-overføringshastigheten til fermentoren (OTR) like før karbonkilden i vekstmediet ble uttømt, ble tilførselen pumpet inn i fermentoren i en hastighet som begrenset bakterielle OUR til ca. 80-90% av fermentorens maksimale OTR. Tilførselshastigheten ble justert manuelt til å gjeninnføre og så opprettholde dOT ved 50% luftmetning under betingelsene som er beskrevet.

c) Fermenteringsfremgangsmåten som beskrevet i (b) ble gjentatt men ved en temperatur på 30°C i 35 timer. Bortsett fra fermenteringstemperaturen på 30°C ble mediet og fermenteringsbetingelsene de samme som beskrevet i (b).

d) Opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 1(f).

Eksempel 14

Tillagning av [Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Arg³⁰]hu G-CSF

Et mutagent templat, M13mp18 som inneholdt genet for [Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]hu G-CSF ble laget som beskrevet i del (d) i Eks. 1 med plasmid pICI 1266 som erstatning for pICI 1080. Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt ved bruk av det ovenfor nevnte templat med mutagent nukleotid betegnet SEQ ID nr. 37. Dette tjener for å overføre kodonet for Lys i posisjon 30 til Arg. Dobbel-kjetet RF DNA ble laget fra en fag som inneholdt den ønskede forandring. En EcoRI-SalI-ekspressjonskassetten ble isolert og klonet i pICI 0080 som beskrevet i Eks. 12 til å gi pICI 1343.

Videre bearbeidelse for å gi tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 3 og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 6.

Eksempel 15

Tillagning av [Arg^{11,23}, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF

Et mutagent templat, M13mp18 som inneholdt genet for [Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF, ble laget som beskrevet i del (d) i Eks. 1 med plasmid pICI 1239 som erstatning for pICI 1080. Fremgangsmåten som ble beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt ved bruk av ovennevnte templat med det mutagene oligonukleotid betegnet SEQ ID nr. 38. Dette tjener til å overføre kodonet for Lys i posisjon 23 til Arg. Dobbel-kjetet RF DNA ble laget fra én fag som inneholdt den ønskede forandring og ekspressjonskassetten ble isolert og klonet som beskrevet i Eks. 14 til å gi pICI 1388.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og rensningen av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 16

Tillagning av [Arg^{11,34}, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 15 ble gjentatt med oligonukleotid betegnet SEQ ID nr. 38 erstattet av SEQ ID nr. 39 (dette tjener til å overføre kodonet for Lys i posisjon 34 til Arg) til å gi pICI 1389.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og rensningen av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 17

Tillagning av [Arg^{11,40}, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 13 ble gjentatt med oligonukleotid SEQ ID nr. 38 erstattet av SEQ ID nr. 40 (dette tjener til å overføre kodonet for Lys i posisjon 40 til Arg) til å gi pICI 1390.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og rensningen av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 18

Tillagning av [Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg^{5,11}, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 15 ble gjentatt med oligonukleotid SEQ ID nr. 38 erstattet av SEQ ID nr. 41 (dette tjener til å overføre kodonene for Thr, Leu, Gly og Pro i posisjonene 1, 3, 4 og 5 til henholdsvis Ala, Thr, Tyr og Arg til å gi pICI 1391. Polypeptidet i dette Eks. illustrerer at modifikasjon av den foreliggende oppfinnelse kan bli brukt på et polypeptid kjent å ha G-CSF-aktivitet for å forbedre løsningsstabiliteten til polypeptidet. Det kjente polypeptid er [Ala¹, Thr³, Tyr⁴, Arg⁵, Ser¹⁷]hu G-CSF som er beskrevet i

europaisk patentpublikasjon nr. 272.703, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og rensningen av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 19

Tillagning av [Arg¹¹, Ser^{17,27}]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 4 ble gjentatt med oligonukletidet SEQ ID nr. 30 erstattet av SEQ ID nr. 28 (dette tjener til å overføre kodonet for Gln i posisjon 11 til Arg). Ekspresjonskassetten ble overført til ekspresjonsplasmidet pICI 0080, istedenfor pICI 0020 som beskrevet i Eks. 14 til å gi pICI 1405.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og rensningen av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 20

Tillagning av [Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 19 ble gjentatt med oligonukleotid SEQ ID nr. 28 erstattet av SEQ ID nr. 29 (dette tjener til å overføre kodonene for Pro i 60 og 65 til Ser) til å gi pICI 1400.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og rensningen av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 21

Tillagning av [Arg¹¹, Ser^{17,27,60}]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 6 ble gjentatt med oligonukleotidene SEQ ID nr. 33 og SEQ ID nr. 34 erstattet av

SEQ ID nr. 28 og SEQ ID nr. 42. Disse tjener til å overføre kodonene for Gln i posisjon 11 og Pro i posisjon 60 til henholdsvis Arg og Ser. Ekspresjonskassetten ble overført til ekspresjonsplasmidet pICI 0080 istedenfor pICI 0020 til å gi pICI 1401.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og rensningen av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 22

Tillagning av [Arg¹¹, Ser^{17,27,65}]hu G-CSF

Frengangsmåten som beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt med oligonukleotid betegnet SEQ ID nr. 29 erstattet med SEQ ID nr. 43 (dette tjener til å overføre kodonet for Pro i posisjon 65 til Ser) til å gi pICI 1418.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og rensningen av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 23

Tillagning av [Ser^{17,27,60}]hu G-CSF

Frengangsmåten som beskrevet i Eks. 19 ble gjentatt med oligonukleotid betegnet SEQ ID nr. 28 erstattet av SEQ ID nr. 42 (dette tjener til å overføre kodonet for Pro i posisjon 60 til Ser) til å gi pICI 1402.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og rensningen av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 24

Tillagning av [Ser^{17,27,65}]hu G-CSF

Frengangsmåten beskrevet i Eks. 4 ble gjentatt med oligonukleotid betegnet SEQ ID nr. 30 erstattet av SEQ ID nr. 43 (dette tjener til å overføre kodonet for Pro i posisjon 65 til Ser) for å gi pICI 1420.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen og opprensning av tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 1.

Eksempel 25

Tillagning av [Arg¹¹,Glu^{15,111},Ser^{17,27,60,65,115,116},Ala^{26,28},Lys³⁰]hu G-CSF

Plasmid pICI 1348, beskrevet i Eks. 8, ble fordøyet med XbaI i buffer M og så med SalI i buffer H og det store XbaI-SalI-vektorfragmentet isolert fra 0,7% agarosegel som beskrevet tidligere. Plasmid pICI 1243, beskrevet i Eks. 4, ble fordøyet med XbaI og SalI som beskrevet ovenfor og det lille XbaI-SalI-fragment isolert fra 0,7% agarosegel og ligert til XbaI-SalI-vektorfragmentet ovenfor. Ligeringsblandingen ble benyttet til å transformere E. coli-stamme MSD 522 og transformantene valgt for vekst på L-agarskåler som inneholdt ampicillin (50 µg/ml). Tre kolonier ble undersøkt for produksjon av protein som beskrevet i Eks. 12, men med å erstatte tetracyklin med ampicillin ved 50 µg/ml. Plasmid DNA fra en koloni som uttrykte det korrekte proteinet ble betegnet pICI 1421.

Videre bearbeidelse for å gi tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 3 og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 6.

Eksempel 26

Tillagning av [Arg^{11,165}, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Glu^{26,28}, Lys^{30,58}]hu G-CSF

Et mutagent templat M13mp18 som inneholdt genet for [Arg¹¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]hu G-CSF ble laget som beskrevet i del (d) i Eks. 1 med plasmid pICI 1348 (beskrevet i Eks. 8) hvilket erstattet pICI 1080. Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt ved bruk av det ovennevnte templat med mutagene oligonukleotider betegnet SEQ ID nr. 28 og SEQ ID nr. 29 erstattet av SEQ ID nr. 44 og SEQ ID nr. 32 (disse tjener til å overføre kodonene for Trp i posisjon 53 til Lys og Tyr i posisjon 165 til Arg) for å gi pICI 1422.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 3 og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 6.

Eksempel 27

Tillagning av [Arg¹¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28,44,51,55}, Lys^{30,49,58}]hu G-CSF

Et mutagent templat ble laget som beskrevet i Eks. 26. Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 4 ble gjentatt ved bruk av ovennevnte templat med mutagent oligonukleotid betegnet SEQ ID nr. 30 erstattet av SEQ ID nr. 45 (dette tjener til å overføre kodonene for Pro i posisjon 44, Leu i posisjon 49 og Gly i posisjonene 51 og 55 til henholdsvis Ala, Lys, Ala og Ala) til å gi pICI 1423.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 3 og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 6.

Eksempel 28

Tillagning av [Arg^{11,165},Glu^{15,111},Ser^{17,27,60,65,115,116},
Ala^{26,28,44,51,55},Lys^{30,49,58}]hu G-CSF

Et mutagent templat ble laget som beskrevet i del (d) i Eks. 1 med pICI 1080 erstattet av pICI 1423, beskrevet i Eks. 27. Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 3 ble gjentatt ved bruk av ovennevnte templat og oligonukleotider betegnet SEQ ID nr. 28 og SEQ ID nr. 29 erstattet av SEQ ID nr. 32 og SEQ ID nr. 30 til å gi pICI 1424.

Videre bearbeidelse til å gi tittelforbindelsen ble utført som beskrevet i Eks. 3 og opprensning ble utført som beskrevet i Eks. 6.

Referanseeksempel 1

Tillagning av hu G-CSF

a) Tillagning av et syntetisk gen for hu G-CSF

En DNA-sekvens (fig. 2) som koder for aminosyresekvensen til polypeptidet i fig. 2 (hu G-CSF) ble betegnet ifølge de følgende betraktninger:

- 1) Enkelt-kjedet "klebrige" ender for å tillate kobling (ligering) på passende seter i et plasmid.
- 2) En serie restriksjons-endonuklease-sekvenser gjennom genet til å underlette etterfølgende genetisk manipulasjon.
- 3) Translasjons-termineringskodon.
- 4) Kodoner i 5'-enden i den kodende region ble normalt være valgt å være A/T-rike. Andre kodoner ble normalt valgt lik dem som foretrukket for ekspresjon i E.coli.

Genet ble laget fra 18 oligonukleotider betegnet SEQ ID nr. 1 - SEQ ID nr. 18 og vist senere.

Tillagning av oligonukleotider

Oligonukleotidsekvensene vist senere ble laget på en Applied Biosystems 380A DNA-syntesemaskin fra 5'-dimetoksytrityl base-beskyttet nukleosid-2-cyanoetyl-N,N-diisopropylfosforamiditt og beskyttede nukleotider bundet til kontrollert porøst glass-støtte på 0,2 μ M skala ifølge protokoller gitt av Applied Biosystems Inc.

Alternativt, kan oligonukleotidsekvensene bli laget ved hjelp av manuelle fremgangsmåter som beskrevet av Atkinson og Smith i "Oligonucleotide Synthesis, a Practical Approach" (M.T. Gait, utg. IRL Press, Oxford, Washington DC, s. 35-81).

I detalj, tillagning av oligonukleotidsekvensene ved bruk av Applied Biosystems 380A DNA-syntesemaskin ble utført som følger:

Hvert oligonukleotid, etter kløvning fra fast støtte og fjerning av alle beskyttelsesgrupper, ble løst opp i vann (1 ml). En løsning på 3M natriumacetat (pH 5,6; 40 μ l) og etanol (1 ml) ble tilsatt oligonukleotidløsningene (400 μ l) og blandingene lagret ved -70° i 20 timer. De resulterende bunnfall ble samlet ved sentrifugering (13.000 opm i 10 min.) og bunnfallene vasket med etanol:vann (7:3) (200 μ l) og så tørret kort i vakuum og løst opp i vann (15 μ l) og 10 μ l av en formamid/farve-blanding, (10 mM NaOH, 0,5 mM EDTA, 0,01% bromfenol-blå, 0,01% xylen-cyanol, 80% formamid).

Oligonukleotidene ble rensset på 10% polyakrylamidgel i 50 mM tris-borat (pH 8,3) som inneholdt 8,3M urea. Oligonukleotider av korrekt lengde ble identifisert ved UV-belysning (Narang et al., 1979 i Methods in Enzymology vol. 68, 90-98) - normalt ble de mest fremtredende bånd - skåret ut fra gelen og elektroeluert i 5 mM tris-borat (pH 8,3) ved 300 mV i 3-4 timer. De vandige løsninger ble konsentrert til ca. 200 μ l ved behandling med butanol (blande, sentrifugere og fjerne det øvre organiske lag). De rensede oligonukleotidene ble bunnfelt ved -70°C i 20 timer fra 0,3M natriumacetatløsning ved tilsetning av etanol (2,5 vol.).

Sammensetning av genet

Oligonukleotider SEQ ID nr. 2 - SEQ ID nr. 17 (400 pM av hver) (som definert heretter) ble fosforylert med T4 polynukleotidkinase (3,6 enheter) i 2 timer ved 37°C i 25 µl i en løsning som inneholdt ATP (800 pM som inneholdt 25 pM gamma-³²P ATP, 100 µM spermidin, 20 mM MgCl₂, 50 mM tris-HCl (pH 9,0) og 0,1 mM EDTA. Løsningene ble varmet opp til 20°C i 5 min. til å avslutte reaksjonene, så blandet i par som vist i tabell 1 til å gi duplekser A til I (oligonukleotider SEQ ID nr. 1 og SEQ ID nr. 18 (400 mM in 25µl) ble benyttet ufosforylert). 0,3M natriumacetat (pH 5,6, 200 µl) og etanol (850 µl) ble tilsatt og dupleksene bunnfelt ved -20°C i 20 timer. De resulterende bunnfall ble samlet ved sentrifugering og vasket med etanol:vann (7:3) og så løst opp i vann (50 µl). Par av oligonukleotider ble koblet sammen ved først å varme opp løsningene til 100°C i 2 min. i et kokende vannbad. Badet ble så tillatt å avkjøle langsomt til 40°C (ca. 4 timer). Løsningene som inneholdt 3 par av dupleksene ble kombinert som vist (se tabell 1) til å gi grupper I til III lyofilisert og løst opp i 30 µl av en løsning som inneholdt T4 DNA-ligase (1 enhet; BRL), 50 mM tris (pH 7,6), 10 mM magnesiumklorid, 5% (w/v) PEG 8000, 1 mM ATP, 1 mM DTT. (BRL, Focus vol. 8 nr. 1 Winter 1986) og DNA ligert ved 30°C i 5 min. etterfulgt av 20 timer ved 16°C. 3M natriumacetat (20 µl) og vann (150 µl) ble tilsatt og produktet bunnfelt ved tilsetning av etanol (750 µl) og avkjølt til -20°C i 20 timer. Presipitatet ble samlet ved sentrifugering og vasket med etanol (1 ml) og så løst opp i vann (15 µl) og formamid/farve-blanding (10 µl) og renset på en 10% polyakrylamidgel i 50 mM tris-borat (pH 8,3), 1 mM EDTA og 8,3M urea. Bånd for kjeder med omtrentlig lengde (173-186 baser) ble identifisert ved autoradiografi og isolert sammen ved hjelp av elektroeluering fra en enkelt gel-bite som beskrevet ovenfor for individuelle oligonukleotidsekvenser. DNA-kjedene ble satt sammen ved først opphetning av en vandig løsning (50 µl) ved 100°C i 2 min., så tillatt å avkjøles til 40° i løpet av 4 timer.

Gruppene I, II og III ble koblet sammen hovedsakelig som beskrevet for gruppetillagning til å gi produktet, gensekvensen

som vist i fig. 2. Etter bunnfelling, ble genet fosforylert med T4 polynukleotidkinase som beskrevet tidligere for individuelle oligonukleotider, så løst opp i vann (20 µl).

Tabell 1

DUPEKS	OLIGONUKLEOTID	ANTALL BASER I	
		TOPP-KJEDE	BUNN-KJEDE
A	SEQ ID nr. 1 + SEQ ID nr. 2	62	64
B	SEQ ID nr. 3 + SEQ ID nr. 4	60	60
C	SEQ ID nr. 5 + SEQ ID nr. 6	48	51
D	SEQ ID nr. 7 + SEQ ID nr. 8	63	60
E	SEQ ID nr. 9 + SEQ ID nr. 10	63	63
F	SEQ ID nr. 11 + SEQ ID nr. 12	60	63
G	SEQ ID nr. 13 + SEQ ID nr. 14	63	60
H	SEQ ID nr. 15 + SEQ ID nr. 16	60	60
I	SEQ ID nr. 17 + SEQ ID nr. 18	55	53
I	A + B + C	170	175
II	D + E + F	186	186
III	G + H + I	178	173

b) Kloning av det syntetiske genet for hu G-CSF

Det syntetiske genet beskrevet ovenfor ble klonet inn i plasmid-vektoren, pSTP1 (Windass et al., Nucleic Acids Research (1983) vol. 10, s. 6639).

For vektortillagning ble 10 µg av STP1 løst opp i vann (37,5 µl) og 10 x B restriksjonsbuffer (4,5 µl) (BCL). Restriksjonsendonukleasen SalI (3 µl) (BCL, 8 enheter/µl) ble tilsatt og blandingen inkubert ved 37°C i 1 time inntil linearisert plasmid dominerte over dobbelt-trinnede og sirkulære "nikket" former. DNA ble utfelt med etanol ved 4°C i 30 min., vasket med etanol:vann (7:3) og så oppløst i vann (39,5 µl), 10 x H buffer (4,5 µl) (BCL). Restriksjonsendonukleasen EcoRI (1 µl) (BCL, 90 enheter/µl) ble tilsatt og blandingen inkubert ved 37°C i 1 time til det store EcoRI-SalI-fragment dominerte.

DNA ble felt ut ved -20°C i 20 timer, vasket med etanol:vann (7:3) og så løst opp i vann (20 μl).

Det store EcoRI-SalI-fragment ble renset i en 1% preparativ agarosegel og elektroeluert og utfelt som beskrevet tidligere, så løst opp i vann (20 μl). For kobling av det syntetiske genet, ble en blanding av vektor-DNA (2 μl av EcoRI-SalI-fragmentløsningen), syntetisk gen (5 μl av den vandige løsning beskrevet tidligere, 5x ligasebuffer (6 μl - 250mM tris pH 7,6, 50 mM MgCl_2 , 25% w/v PEG 8000, 5 mM ATP, 5 mM DTT eksBRL) vann (15 μl) og T4 DNA ligase (2 μl , 1 U/ μl) inkubert ved 16°C i 4 timer. DNA-blandingen ble benyttet direkte (enten 1 μl av netto koblingsblanding eller 2 μl av koblingsblandingen fortynnet 5x med vann) til å transformere E. coli-stamme HB101. DNA-blandingen (1 eller 2 μl) ble tilsatt de kompetente E. coli HB101-celler (20 μl , BRL) på is og blandingen inkubert på is i 45 min. og så varmebehandlet ved 42°C i 45 sekunder. Etter 2 min. på is, ble 100 μl av SOC-buffer (baktotrypton 2%; gjær-ekstrakt 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl_2 , MgSO_4 20 mM (10 mM hver); glukose 20 mM) ble tilsatt og blandingen inkubert ved 37°C i 1 time. Prøver av blandingsene ble sådd ut på L-skåler med 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ampicillin. Transformanter ble undersøkt for nærvær av klonet syntetisk gen ved koloni-hybridiseringsanalyse under standard fremgangsmåter beskrevet i "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" av Maniatis et al., (Cold Spring Harbor) og i UK-patentsøknad nr. 8502605. Totalt ble 100 kolonier sådd ut på filtere (Schleicher og Schuell), dyrket ved 37°C i 20 timer, løst opp og bakt. Filteret ble hybridisert ved 65°C i 20 timer med en radioaktiv "probe" laget fra oligonukleotidsekvens SEQ ID nr. 1 ved bruk av en vilkårligmerkningskit (Pharmacia). 5 kolonier 1-5 som ga et positivt hybridiseringssignal ble dyrket opp i L-mediet ved 37°C i 20 timer i en liten skala (100 ml) og plasmid-DNA laget ved sentrifugering i en cesiumklorid-gradient hovedsakelig som beskrevet i "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" av Maniatis et al., (Cold Spring Harbor).

DNA-ble sekvensert ved standard dideoksykjede-termineringsfremgangsmåte som beskrevet av Sanger et al., i Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977) ved bruk av Sequenase®-kit

(United States Biochemical Co.). Oligonukleotidene SEQ ID nr. 19 til SEQ ID nr. 23 (som definert heretter og se tabell 2) ble benyttet som sekvenserings-"primere".

Tabell 2

<u>Kode</u>	<u>"Primer"-sete</u>
SEQ ID nr. 19	214-234 øvre kjede
SEQ ID nr. 20	333-353 øvre kjede
SEQ ID nr. 21	375-395 nedre kjede
SEQ ID nr. 22	207-227 nedre kjede
SEQ ID nr. 23	69-93 nedre kjede

Plasmid-DNA fra klon 5 inneholdt DNA-sekvensen vist i fig. 2. Plasmidet (pAG88) ble benyttet til å transformere kompetente celler av de følgende E. coli-stammer ved standardfremgangsmåte:

HB101

CGSC 6300 (heretter også referert til som MSD 522)

E. coli-stammene HB101 og MSD522 (CGSC 6300) er fritt tilgjengelige. Således kan de f.eks. bli oppnådd fra E. coli Genetic Stock Centre, Yale University, USA. Videre kan E. coli HB101 bli i tillegg oppnådd fra f.eks. BRL forsynt av GIBCO Ltd., Unit 4, Cowley Mill Trading Estate, Longbridge Way, Uxbridge, UB8 2YG, Middlesex, England eller GIBCO Laboratories, Life Technologies Inc., 3175 Staley Road, Grand Island, NY 14072, USA. Genotypen av stamme HB101 er beskrevet i den tidligere nevnte "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" som Sup E44 hsd S20 ($r_B^- m_B^-$) rec A 13 ara-14 F⁻leu 6 thi-1 proA2 lac Y1 gal K2 rps L20 xyl⁻⁵ mtl⁻¹. Genotypen av MSD 522 (CGSC 6300) er vist i Eks. 13.

c) Kloning av genet for hu G-CSF i en ekspresjonsvektor

Genet beskrevet ovenfor ble klonet i plasmidet pICI 0020 som beskrevet i Eks. 1(c) til å gi ekspresjonsplasmidet pICI 1056.

d) Fermentering

Plasmidet pICI 1056 ble transformert og fermentering utført som beskrevet i Eks. 1(e) til å oppnå ekspresjon av hu G-CSF.

e) Opprensning

Rensning ble utført som beskrevet i den andre rensningsfremgangsmåten utviklet til å gi større mengder av hu G-CSF beskrevet på sidene 48 og 49 i PCT-patentpublikasjon nr. WO 87/01132 med endelig dialyse utført mot fosfatbufret saltvann.

Referanseeksempel 2

Tillagning av gener for forbindelser av hu G-CSF ved sete-rettet mutagenese.

Fosforotioat-fremgangsmåten til Eckstein og medarbeidere ble benyttet:

Taylor, J.W. et al., Nucleic Acids Research (1985) Vol s. 8749-8764

Taylor, J.W. et al., Nucleic Acids Research (1985) Vol s. 8765-8785

Nakamaye, K. et al., Nucleic Acids Research (1986) Vol s. 9679-9698

Sayers, J.R. et al., Nucleic Acids Research (1988) Vol s. 791-802.

Fremgangsmåten kan utføres ved bruk av et kit laget av Amersham International. Fremgangsmåten er beskrevet nedenfor og omfatter forandringer i den opprinnelige fremgangsmåte med hensyn til bruken av flere enn 1 mutagen oligonukleotid og inkubasjonstemperaturen for oligonukleotider som er større enn 30 baser lange.

1. Kobling av mutert oligonukleotid til enkelt-kjedet DNA-templat;

Enkelt-kjedet DNA-templat (1 µg/µl)

5 µl

Fosforylert mutagent oligonukleotid (1,6pmol/1µl))

2,5 µl

Buffer 1	3,5 µl
Vann	6 µl

(Der 2 mutagene oligonukleotider ble benyttet samtidig, ble 2,5 µl (1,6 pmol/1 µl) av hvert fosforylert nukleotid satt til 5 µl enkelt-kjedet DNA-templat (1µg/µl) i 3,5 µl Buffer 1 og 3,5 µl vann. Der 3 mutagene oligonukleotider ble benyttet ble 2,5 µl (1,6 pmol/µl) av hvert fosforylert oligonukleotid satt til 5 µl enkelt-kjedet DNA (1 µg/µl) i 3,5 µl Buffer 1 og 1 µl vann). Bestanddelene ovenfor ble plassert i et forseglet rør i 70°C vannbad i 3 min. hvis oligonukleotidet var <30 baser lange eller et kokende vannbad i 3 min. hvis oligonukleotidet var >30 baser lange. Røret ble så plassert i et 37° vannbad i 30 min.

2. Syntese og kobling (ligering) av mutert DNA-kjede:

Til reaksjonsblandingen ble tilsatt

MgCl ₂ -løsning	5 µl
Nukleotidblanding 1 (inneholder dCTP α S)	19 µl
Vann	6 µl
Klenow-fragment (6 enheter)	1,5 µl
T4 DNA-ligase (5 enheter)	2 µl

Ingrediensene ovenfor ble plassert i et 16°C vannbad og etterlatt over natten.

3. Fjernelse av enkelt-kjedet (ikke-mutert) DNA ved bruk av éngangs sentrifugeringsfilter-enheter.

Til reaksjonen fra trinn 2 ble de følgende ingredienser tilsatt:

Vann	170 µl
5M NaCl	30 µl

Prøven på 250 µl ble satt til topp-halvdelen av filter-enheten og sentrifugert ved 1500 opm i 10 min. ved romtemperatur i en Sorvall RT6000B benk-topp-sentrifuge ved bruk av en Sorvall H1000B sving-ut-rotor. Prøven går gjennom to nitrocellu-

losemembraner som binder den enkelt-kjedede DNA men lar den dobbelt-kjedede DNA passere gjennom til samlerøret under. 100 µl av 500 mM NaCl ble tilsatt og sentrifugert igjen i 10 min. for å vaske gjennom gjenværende RF DNA.

De følgende ingredienser ble satt til filtratet:

3M natriumacetat (pH 6,0)	28 µl
Kald etanol (-20°C)	700 µl

Blandingen ble plassert på tørris og etanolbad i 20 min. og sentrifugert i en Eppendorf-mikrosentrifuge i 15 min. Pelleten ble så resuspendert i 10 µl buffer 2.

4. "Nicking" av den ikke-muterte kjede ved bruk av Nci I.

Til reaksjonsblandingen fra trinn 3, ble tilsatt 65 µl buffer 3 og 8 enheter Nci I (1 µl). Blandingen ble plassert i et vannbad ved 37°C i 90 min.

5. Spalting av ikke-mutert kjede ved bruk av eksonuklease III

Til reaksjonsblandingen fra trinn 4 ble tilsatt

500 mM NaCl	12 µl
Buffer 4	10 µl
Eksonuklease III (50 enheter)	2 µl

Blandingen ble plassert i et 37°C vannbad og inkubert i 30 min. ved 37°C, 50 enheter eksonuklease III vil fordøye ca. 3.000 baser i 30 min. Blandingen ble så plassert på et 70°C vannbad i 15 min. for å inaktivere enzymene.

6. Repolymerisering og ligering av det delvis spaltede DNA.

Til reaksjonsblandingen fra trinn 5 ble tilsatt

Nukleotidblanding 2	13 µl
MgCl ₂ -løsning	5 µl

DNA-polymerase I (4 enheter)	1 µl
T4 DNA-ligase (2,5 enheter)	1 µl

Blandingen ble plassert i et 16°C bad i 3 timer.

7. Transformasjon av kompetente vert- E. coli-celler med DNA:

300 µl av nylig lagede kompetente E. coli TG1-celler (laget ifølge metoden til Mandel og Higa) ble transformert med 20 µl av reaksjonsblandingen fra trinn 6 (i duplikat). Transformantene ble sådd ut under vekst i log-fase TG1-celler i TY Top-agar på TY-skåler og inkubert over natten ved 37°C.

E. coli-stammen TG1 er fritt tilgjengelig fra f.eks. E. coli Genetic Stock Centre, Yale University, USA og fra Amersham International plc, Amersham Place, Little Chalfont, Amersham, Buckinghamshire HP7 9NA, England som gitt i deres "in vitro" mutagenesesystem, oligonukleotid-anrettede kit (produkt-kode RPN 1523).

Referanseeksempel 3

G-CSF-bioassay

En faktor-avhengig cellelinje, Paterson - G-CSF (FDCP-G), oppnådd fra Paterson Institute, Manchester, England ble klonet ved begrenset fortynning i nærvær av G-CSF. En G-CSF-følsom klon, betegnet klon E7, ble benyttet for å bestemme human rekombinant G-CSF-aktivitet. $2,5 \times 10^3$ FDCP-G klon E7-celler i 100 µl RPMI 1640 + 10% FCS ble satt til en likt volum RPMI 1640 + 10% FCS som inneholder G-CSF. Hver G-CSF-prøve ble målt over 10 fordobblende fortynninger. Det endelige volum av RPMI 1640 (se Moore GE et al., (1967) JAMA, 199, 519) + 10% FCS (føtalt kalveserum) i hver brønn i en 96-brønn-mikrotiterskål var 200 µl. Mikrotiterskålen ble inkubert ved 37°C i 5% CO₂ i en fuktig inkubator i 4 dager. 1,0 µCi titrert thymidin ble tilsatt pr. brønn og inkubert under de siste 6 timene. Cellene ble høstet på glassfiber-filterpapir og mengden radioaktivitet bestemt ved væskescintillasjonstelling. Mengden av tritert

thymidin-innmerkning ble funnet å være direkte proporsjonal til mengden G-CSF til stede. FDCP-G-klon E7-metoden ble kalibrert ved bruk av rekombinant hu G-CSF oppnådd fra Amersham International med en skrevet spesifikk aktivitet på 10^8 enheter/mg protein.

Aktivitetene til G-CSF-prøvene ble bestemt ved sammenligning til en standard med kjent aktivitet.

Enhetene av G-CSF-aktiviteten pr. ml ble beregnet ifølge den følgende formel:

Fortynning av G-CSF	Fortynning av prøve	Enheter/ml
standard i 50%	i 50% maksimal	aktivitet
maksimal økning	- økning i 3^H -	X i G-CSF-
i 3^H -thymidin-	thymidin-	standard
inkorporering	inkorporering	

Referanseeksempel 4

Løsningsstabilitet til G-CSF og forbindelser av denne

Passende fortynninger av stamløsningen til G-CSF og forbindelsene i fosfatbufret saltvann (PBS) ved 4°C som beskrevet i Eks. 9 ble testet med hensyn til løsningsstabilitet. Løsninger på 1 mg/ml, 5 mg/ml og noen ganger 10 mg/ml protein i PBS ble inkubert ved 37°C i 14 dager. Løsningene ble inspisert visuelt med regelmessige intervaller overfor tegn på utfelling. Etter 14 dager ble hver løsning sentrifugert ved 14.000 opm i 20 min., supernatanten fjernet ved dekantering og pelleten løst opp igjen i PBS som inneholdt 1% w/v N-lauroyl-sarkosin. Det totale proteininnholdet i hver supernatant og re-gjenoppløst presipitat ble vurdert ved A_{280} -målinger og monomerinnholdet i hver ble vurdert ved reversfase-HPLC. Disse ble uttrykt som en prosent av de korresponderende resultater gitt av løsningene ved start av inkuberingen og ved en 1 mg/ml-løsning inkubert ved 4°C i 14 dager. Variasjoner mellom totalt protein og monomer-bestemmelsene ble observert bare i noen av de igjen-

oppløste bunnfallene. Prosent protein som ble igjen i løsningen i supernatantene fra hver startkonsentrasjon er oppført i tabellen.

Den spesifikke aktiviteten til produktet i hver supernatant etter inkubasjon ble vist å være den samme som i startløsningen, og ingen forskjeller ble observert på PAGE-SDS under reduserende eller ikke-reduserende betingelser.

De følgende resultater ble oppnådd:

G-CSF-forbindelser	Spes. akt. U/mg x 10 ⁹)	<u>Løsningsstabilitet*</u>		
		1mg/ml	5mg/ml	10mg/ml
[Met ⁻¹]hu G-CSF	0,4	23	nd	nd
[Met ⁻¹ ,Ser ¹⁷]hu G-CSF	1,0	80	20	nd
[Met ⁻¹ ,Ser ^{17,27}]hu G-CSF	1,5	80	40	nd
[Met ⁻¹ ,Arg ¹¹ ,Ser ^{17,27,60,65}]				
hu G-CSF	1,2	98	94	92
[Met ⁻¹ ,Ser ^{17,27} ,Glu ¹¹¹ , Ser ^{115,116}]hu G-CSF	2,7	100	72	50
[Met ⁻¹ ,Ser ^{17,27} ,Arg ^{11,165} , Lys ⁵⁸]hu G-CSF	1,2	92	77	47
[Met ⁻¹ ,Glu ¹⁵ ,Ser ^{17,27} , Ala ^{26,28} ,Lys ³⁰]hu CSF	1,0	100	100	94
[Met ⁻¹ ,Ser ^{17,27} ,Lys ^{49,58} , Ala ^{44,51,55}]hu G-CSF	1,0	84	69	44
[Met ⁻¹ ,Arg ¹¹ ,Glu ¹⁵ , Ser ^{17,27,60,65} ,Ala ^{26,28} , Lys ³⁰]hu G-CSF	2,6	100	103	93
[Met ⁻¹ ,Glu ¹⁵ ,Ser ^{17,27} , Ala ^{26,28} ,Arg ³⁰]hu G-CSF	0,85	100	100	100
[Met ⁻¹ ,Arg ^{11,23} , Ser ^{17,27,60,65}]hu G-CSF	2,5	100	98	88
[Met ⁻¹ ,Arg ^{11,34} , Ser ^{17,27,60,65}]hu G-CSF	1,4	105	92	80
[Met ⁻¹ ,Arg ^{11,40} , Ser ^{17,27,60,65}]hu G-CSF	1,3	108	100	87
[Met ⁻¹ ,Ala ¹ ,Thr ³ ,Tyr ⁴ ,				

Arg ^{5,11} ,Ser ^{17,27,60,65}]- hu G-CSF	1,5	106	100	89
[Met ⁻¹ ,Arg ¹¹ ,Glu ^{15,111} , Ser ^{17,27,60,65,115,116} , Ala ^{26,28} ,Lys ³⁰]hu G-CSF	0,5	100	100	100
[Met ⁻¹ ,Arg ^{11,165} ,Glu ¹⁵ , Ser ^{17,27,60,65} ,Ala ^{26,28} , Lys ^{30,58}]hu G-CSF	0,65	100	100	100
[Met ⁻¹ ,Arg ¹¹ ,Glu ¹⁵ , Ser ¹⁷ , 27,60,65,Ala ^{26,28,44,51,55} , Lys ^{30,49,58}]hu G-CSF	0,20	100	100	95
[Met ⁻¹ ,Arg ^{11,165} ,Glu ^{15,111} , Ser ^{17,27,60,65,115,116} ,Ala ²⁶ , 28,44,51,55,Lys ^{30,49,58}] hu G-CSF	0,05	100	100	100
[Met ⁻¹ ,Arg ¹¹ ,Ser ^{17,27}]hu CSF	0,73	97	35	12
[Met ⁻¹ ,Ser ^{17,27,60,65}]- hu G-CSF	0,71	100	94	86
[Met ⁻¹ ,Arg ¹¹ ,Ser ¹⁷ , 27,60]hu G-CSF	0,81	99	65	32
[Met ⁻¹ ,Arg ¹¹ ,Ser ^{17,27,65}]- hu G-CSF	0,80	100	96	89
[Met ⁻¹ ,Ser ^{17,27,60}]hu G-CSF	0,80	95	68	36
[Met ⁻¹ ,Ser ^{17,27,65}]hu G-CSF	0,83	100	94	90

*prosent tilbake i løsning i PBS etter 14 dager ved 37°C
(vurdert ved UV; ved HPLC-tilgjengelighet)

nd betyr ikke gjort

[Met⁻¹, Ser¹⁷]hu G-CSF kan bli oppnådd som beskrevet i Referanse-
eksempel 5.

Resultatene ovenfor viser at modifikasjoner av foreliggende
oppfinnelse forbedrer løsningsstabilitet uten tap av G-CSF-
aktivitet, [Met⁻¹,Ser¹⁷]hu G-CSF i en konsentrasjon på 5 mg/ml
starter å falle ut innen 3 timer.

Referanseeksempel 5Tillagning av [Ser¹⁷]hu G-CSF

Fremgangsmåten beskrevet i Eks. 2 for tillagning av [Met⁻¹, Ser^{17,27}]hu G-CSF ble gjentatt bortsett fra som følger:

- 1) Dupleks for fosforylering ble laget fra oligonukleotid-sekvensene SEQ ID nr. 24, 25, 3 og 4, sekvensene SEQ ID nr. 3 og 4 erstattet henholdsvis sekvensene SEQ ID nr. 26 og 27 benyttet i Eks. 1 og 2.
- 2) Dupleksten henvist til i (1) ble fosforylert med T4 polynukleotidkinase, men ble fordøyet med SnaBI (10 enheter) i 1 x M buffer (BCL; 30 µl) i 2 timer ved 37°C.
- 3) Etter rensning med etanol, ble 72 bp EcoRI-SnaBI-fragmentet rensset som i motsetning til 143 bp EcoRI-MstII-fragmentet.
- 4) Det syntetiske EcoRI-SnaBI-fragmentet ble klonet i plasmidvektoren pAG88 som beskrevet i Referanseeksempel 1 og vektorpreparatet pAG88 ble fordøyet med SnaBI (20 enheter; BCL) i 1 x M buffer (BCL; 100 µl) i 2 timer ved 37°C istedenfor MstII i 1 x H buffer.
- 5) Etter presipitering med etanol, ble det store EcoRI-SnaBI-fragmentet rensset på en 1% agarosegel i motsetning til det store EcoRI-MstII-fragmentet.
- 6) Plasmidet som inneholdt genet for [Ser¹⁷]hu G-CSF ble betegnet pICI 1105.

Referanseeksempel 6Konstruksjon av pICI 0080a) Konstruksjon av pTB357 (også referert til herved som pLB 004

Plasmid pTB357 benytter en undertrykket tetracyklin-resistent determinant, som funnet på det naturlig forekommende plasmid RP4. Dette undertrykkede system avvikler ekspresjon av tetA-genet i fravær av tetracyklin mens de fleste legemiddel-resistente mekanismer har en konstitutiv (klonisk) ekspresjon.

tet-lokuset ble først kartlagt på RP4 av Barth og Grinter (J.Mol.Biol., 113: 455-474, 1977). Dette ble vist å bestå av tilstøtende gener: tetA, struktur-resistens-genet og tetR, repressorgenet og denne region er blitt sekvensert (Klock et al., J. Bacteriol: 161:326-332, 1985). Disse gener er lokalisert på tilstøtende BglIII-SmaI og SmaI-SmaI-fragmenter. BglIII-setet er unikt i RP4 men det er fem SmaI-seter (Lanka, Lurz og Furste, Plasmid 10:303-307, 1983).

i) Kloning av tetA + tetR-genene

Plasmid RP4 er vel dokumentert (Datta et al., J. Bacteriol 108: 1244, 1971) og er fritt tilgjengelig. Videre er plasmidet RP4 blitt deponert hos National Collection of Type Cultures, 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT under registreringsnummerne 50078 og 50437. E. coli-stammer som inneholder dette plasmid ble dyrket i selektivt kulturmedium og plasmid-DNA ble isolert og skalert opp av metoden til Holmes og Quigley (Holmes and Quigley, Anal. Biochem. 114:193-197, 1981). Det ble deproteinisert ved behandling med 2,5M ammoniumacetat og igjen bunnfelt med isopropanol. Dette plasmid-DNA ble behandlet, ifølge tilvirkers anbefalinger, med restriksjonsenzym BglIII og kuttet fullstendig. Det ble så delvis kuttet ved XmaI ved bruk av fortynnet enzym og kort inkuberingstid. XmaI er en isoschizomer av SmaI men som produserer 4-nukleotid-klebrige ender ved kløvningssetene.

Vektorplasmidet pUC8 (Yanisch-Perron, Vieira and Messing, Gene 33: 103-119, 1985) ble laget på samme måte og kuttet fullstendig med BamHI og XmaI. RP4-fragmentene ble klonet inn i denne vektor ved sammenbinding ved hjelp av T4-ligase ved 12°C i 16 timer. Dette ble benyttet for å overføre E-coli C600 som ble gjort kompetente ved kalsiumkloridmetoden (Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Kulturer ble så sådd ut på medium med seleksjon for tetracyklinresistens.

E. coli C600 er fritt tilgjengelig fra tallrike kilder inklusive mange kultursamlinger, f.eks. E. coli Genetic Stock Centre, Yale University, USA under registreringsnummer GCSC

3004. Genotypen til E.coli C600 er K12 thr-1 leuB6 thi-1 hsdS1 lacY1 tonA21 λ^1 supE44.

Flere kolonier med denne resistens ble undersøkt for den forventede fenotype (ampicillin og tetracyklin-resistens men ikke kanamycin-resistens hvilket indikerte RP4 selv). Kolonier med de riktige resistenser ble undersøkt ved hjelp av klonanalyse ved å isolere plasmid-DNA (Holmes og Quigley-metode). Disse prøver ble kuttet med EcoRI og HindIII og analysert ved hjelp av gel-elektroforese. Dette etablerte størrelsen på det klonede innskudd som ble funnet å være 2,45 kb hvilket var forutantatt for BglII - XmaI - XmaI-fragmentet fra RP4. En klon som hadde dette fragment som inneholdt tetA og tetR-genene ble betegnet pTB344.

ii) Fjernelse av tet-genet fra pAT153

Det var nødvendig å fjerne tet-genet fra vektorplasmidet pAT153 før innsetting i tetA + tetR-kassetten fra RP4 for å hindre gen-duplikasjon som kan være en årsak til genetisk ustabilitet. Også tet-genet kan ikke være effektivt under trykket av det ikke-kognate tetR. Fjernelsen ble gjort ved å isolere plasmid pAT153 DNA og kutting med EcoRI og AvaI. Mellom disse setene ble syntetiske oligonukleotider med sekvensen SEQ ID nr. 59:

```
5' AATTCGCATGCGGATCCATCGATC3'
3' GCGTACGCCTAGGTAGCTAGAGCC5'
```

klonet. Disse passer EcoRI og AvaI klebrige ender og inneholder SpHI, BamHI og ClaI-seter i tillegg. Etter transformering og seleksjon, ble koloniene testet for tap av tetracyklin-resistens-egenskapen. Plasmid DNA fra 1 klon ble sekvensert for å bekrefte at den forutantatte sekvensen var korrekt. Dette plasmid ble betegnet pCH19.

iii) Innsetting av tetA + tetR-genene

tetA og tetR-genene ble isolert fra pTB344 på et EcoRI til PstI-fragment. pUC8-vektoren ble ødelagt ved å kutte med SspI fordi det bærer den samme seleksjonsegenskap (ampicillin-resistens) som pCH19. Plasmid pCH19 DNA ble kuttet med EcoRI og PstI og så ligert med 2,45 kb-fragmentet som bar tet-genene. Dette ble benyttet for å transformere E.coli C600, kulturen ble sådd ut under seleksjon for tetracyklin-resistens-kolonier. Innsetting av tet-genene ble laget for å erstatte mesteparten av bla-genene i pCH19 som skulle således miste sin ampicillin-resistensegenskap. Tap av ampicillin-resistens fra transformantene ble bekreftet. Noen få kloner ble så benyttet for å isolere plasmid-DNA som så var gjenstand for restriksjonsanalyse. Dette bekreftet at det konstruerte plasmid hadde den ønskede struktur. Det ble betegnet pTB351.

iv) Innsetting av cer-sekvensen

Det naturlig forekommende plasmid ColEI er meget stabilt beholdt i E.coli, mens dens forbindelse pBR322 og pAT153 ikke er det. Summers and Sherratt (Cell, 36: 1097-1103, 1984) viste at dette var forårsaket av at forbindelsene ikke inneholdt et kort (283 bp) sekvens kalt cer som er til stede i utgangs-plasmidet. Denne sekvens inneholder et sete-spesifikt plasmid-multimer-bestemmelsessystem som hindrer oppsamlingen av plasmid-multimerer dannet ved homolog rekombinasjon. Slike multimerer har en ødeleggende effekt på fordelingsmekanismen som normalt sikrer stabil arv av datter-plasmidene under bakterienes celledeling.

cer-sekvensen (D. Summers et al., MGG, 201, s. 334-338, 1985) ble isolert fra plasmid pKS492 (gitt av D. Sherratt) som et 289 bp-fragment ved å kutte med BamHI og TaqI. Plasmidet pTB351 ble isolert som DNA fra en dam-stamme av E. coli for å hindre at dens ClaI-sete er blokkert av dam + metylerings-systemet. Dette DNA ble kuttet med BamHI og ClaI (begge disse seter er blitt introdusert på det syntetiske oligonukleotid for denne kloning). cer-fragmentet ble ligert med den kuttete

vektor og så benyttet for å transformere *E. coli* C600, seleksjonen blir gjort for tetracyklin-resistens. Transformerte kolonier ble gjenstand for kloneanalyse ved *Ava*I-restriksjon og gel-elektroforese. Tilst deværelsen av et ekstra DNA-bånd på ca. 300 bp indikerte at *cer*-fragmentet var oppnådd. Videre restriksjonsanalyse ble benyttet for å bekrefte at de resulterende plasmider hadde den korrekte struktur. En av disse ble betegnet pTB357 (fig. 5) og også betegnet pLB004.

b) Plasmid pCH101

Plasmidet pCH101 svarer til pICI 0020 (se Eks. 1c) bortsett fra at *Eco*RI-*Sal*I-fragmentet (se fig. 1) er erstattet av et fragment som består av SEQ ID nr. 53 (se fig. 6 også) og interferon- α_2 -gensekvensen som beskrevet av M.D. Edge et al., *Nucleic Acids Research* 1983, vol. 11, s. 6419-6435. I denne henseende ligger 3'-terminale ATG-kodon til SEQ ID nr. 53 like foran TGT-kodonet som koder for cystein (aminosyre 1) i interferon- α_2 -sekvensen til den ovenfor nevnte M.D. Edge et al., *Nucleic Acids Research* referanse. 5'-nukleotidsekvensen GATCCATG og den komplementære 3'-nukleotidsekvensen GTAC er således fjernet fra nukleotidsekvensen i den ovenfor nevnte referanse.

c) Innsetting av en ekspresjonskassetten inn i pTB357

En ekspresjonskassetten som inneholdt *trp*-promotoren, et ribosom-bindingssete og interferon- α_2 -genet ble isolert fra plasmid pCH101 (se (b) ovenfor) på et *Eco*RI til *Sph*I-restriksjonsfragment. Dette ble bundet til produksjonsvektoren (pTB357) (se (a) ovenfor) som ble kuttet på samme måte med *Eco*RI og *Sph*I. Dette DNA ble benyttet for å transformere en kompetent kultur med *E. coli* C600 og tetracyklin-resistenskolonier ble isolert. Noen av disse ble testet ved DNA-kloneanalyse for å oppnå *Sst*I-restriksjonssetet som fantes på ekspresjonskassetten. Positive kloner i dette henseende ble videre testet ved restriksjonskartlegging for å vise at den forventede konstruksjon var korrekt. De ble også undersøkt for deres overføringsevne til å

produsere interferon- α_2 -protein slik som analysert på en polyakrylamid-SDS-gel farvet med Coomassie blått. En slik bekreftet klon ble betegnet pLB005.

d) Innsettning av T4 transkripsjonsterminator inn i pTB 244

T4-transkripsjonsterminatorsekvensen i form av SallI til HindIII-fragmentet (67 basepar langt) (se SEQ ID nr. 51 og fig. 4a) ble satt inn i multikloningssettet til en mellomvektor pTB 244 (beskrevet i europeisk patentpublikasjon nr. 237.269) mellom dets SallI og HindIII-seter. Klon-analyse ble benyttet til å bekrefte strukturen av denne konstruksjon (pTB244. T4 ter). Fra denne vektor, ble et SstI til SphI-fragment som inneholdt mesteparten av multikloningssettet og T4-terminatoren så isolert. Dette ble satt inn i pLB005 og på samme måte kuttet med SstI og SphI og derved erstatte interferon- α_2 -genet men etterlate en kassett som består av trp-promotoren, multikloningssettet og T4-terminator. Denne konstruksjon ble bekreftet ved klon-analyse og plasmidet betegnet pLB013.

e) Erstatning av multikloningssettet

Multikloningssettet i pLB013 er ikke ideelt for denne vektor på flere måter: SallI, BamHI og SmaI-setene er ikke unike men forekommer andre steder i plasmidet. Dette fragment ble derfor skåret ut ved å kutte med SstI og XbaI (begge unike) og syntetiske oligonukleotider med sekvensen til SEQ ID nr. 54:

5' AGCTCCATATGGTACCAGATCTCTCGAGAGTACTT
GGTATACCATGGTCTAGAGAGCTCTCATGAAGATC 5'

ble satt inn i dets plass. Kloner ble analysert for å besitte de nye restriksjonssettene og så bekreftet ved sekvensering. Ett slikt plasmid ble betegnet pLB014. De nye kloningssettene innsatt på denne måte er: NdeI, KpnI, BglII, XhoI og ScaI med det tidligere XbaI og SallI etterfølgende disse.

f) Videre modifikasjon

Det ble oppdaget at de tilstøtende SstI og NdeI-setene i pLB014 kunne bli kuttet med begge disse restriksjonsenzymene enten samtidig eller etter hverandre sannsynligvis på grunn av deres nære tilknytning. Tilleggssekvenser ble derfor satt inn mellom dem. Dette ble gjort ved å kutte pLB014 med SstI og KpnI og så innsetting av det syntetiske oligonukleotid SEQ ID nr. 55.

5' AGCTCAGCTGCAGCATATGGTAC
GTCGACGTCGTATAC 5'

Kloner ble analysert for å ha et ekstra PvuII eller PstI-sete og så bekreftet ved sekvensering. Ett slikt plasmid ble betegnet pLB015 (=pICI 0080) (se fig. 7). Dette plasmid, forskjellig fra pLB014, er effektivt kuttet ved SstI og NdeI. Dette er for å gi en plass til å sette inn en rekke ribosom-bindingssetesekvenser som er riktig posisjonert med hensyn til oppstrøms trp-promotoren og med NdeI som er benyttet for å gi ATG-startkodonet til genet som skal uttrykkes.

Referanseeksempel 7Tillagning av plasmid pICI 1295 (også referert til som pCG300)a) Produksjon av pCG54 fra pICI1079

pICI1079 er et ampicillin-resistent, pAT153-utviklet plasmid som inneholder de følgende elementer mellom EcoRI og StyII-restriksjonssetene:

- (i) et CI857 fra fag λ ;
 - (ii) en λP_L -promotor;
 - (iii) et syntetisk ribosom-bindingssete;
 - (iv) en syntetisk interferon- α_2 -gensekvens;
 - (v) en syntetisk transkripsjons-terminatorsekvens
- fra fag T4, mellom SalI og StyI-restriksjonssetene. DNA-

sekvensen i denne transkripsjonsterminatoren er vist i fig. 4 og SEQ ID nr. 56.

pICI1079 er illustrert i fig. 8.

pICI1079 er blitt deponert under Budapest Tr aty, ved the National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB2 1RY, Scotland, UK. (NCIMB No 40370, dato for deponering er 19. februar 1991).

pcG54 ble laget for å gjøre tilgjengelig en ekspresjonsvektor som inneholdt den samme promotor, ribosom-bindingssetet og transkripsjons-terminatorsekvenser som vist, d.v.s. λp_{L1} , RBS7 og T4, men som mangler gensekvensen som koder for produksjon av et spesifikt protein. En slik konstruksjon ville gi mulighet for en basal ekspresjonsvektor som inneholdt vesentlige elementer som tillater transkripsjon og translasjon for produksjon av ethvert protein av interesse som kunne bli satt inn i denne vektor ved hjelp av kloningstrinn.

Konstruksjonen av vektoren ble startet ved restriksjons-endonukleasespaltning av pICI1079 ved dens henholdsvis EcoRI og SalI-seter. Dette kløvningstrinn frigjorde et vektorfragment som inneholdt pICI1079-skjelettet komplett med gener for plasmid-replikasjon og antibiotika-resistens-funksjoner, pluss T4-transkripsjonsterminator-sekvensen. Fragmentet ble isolert ved agarosegel-rensningstrinn ved bruk av GeneClean for endelig rensning av DNA-fragmentet.

Til dette vektorfragment ble et annet mindre DNA-fragment på omkring 1,2Kb i størrelse satt inn. Dette andre fragment kan bli oppnådd, f.eks. ved DNA-syntese eller ved seterettet eller PCR-mutagenese av det lille EcoRI-SalI-restriksjonsfragment oppnådd fra pICI1079 som beskrevet ovenfor. Dette andre fragment inneholdt nøyaktig samme promotor og ribosom-bindings-sekvenser som opprinnelig til stede i pICI1079 og i tillegg hadde EcoRI og SalI-seter tilgjengelige henholdsvis ved dets 5' og 3'-ender, slik at det ga overensstemmende ender for kobling til pICI1079-fragmentet. En koblingsreaksjon i nærvær av Gibco-BRL-enzym T4 DNA-ligase og dets riktige buffer, resulterte i dannelsen av konstruksjonen pcG54.

Kloner som inneholdt denne konstruksjon ble opprinnelig

isolert etter transformasjon av en prøve av koblingsreaksjonsblanding inn i E. coli-kompetente celler av stamme HB101.

Konstruksjon pCG54 som ble gjenvunnet var på 3,682Kb i størrelse og inneholdt vesentlige egenskaper som beskrevet i kartet vist i fig. 9.

b) Produksjon av pCG61 fra pCG54 (også betegnet som pICI54)

Syntetiske oligonukleotidsekvenser ble laget slik at de inkluderte både den naturlige sekvensen til T7A3-promotoren og også en sekvens som kunne gi en effektiv translasjons-start-region for å tillate korrekt prosessering av enhver polypeptid-gensekvens som var klonet inn til denne. En passende kandidat-sekvens for denne siste region ble identifisert som RBS1, trp-ribosom-bindingsssekvensen. Derfor ble to komplementære oligonukleotider identifisert som SEQ ID nr. 57 og SEQ ID nr. 58 og syntetisert til å gi en dobbeltkjedet DNA-"linker" som besto av T7A3-promotoren og RBS1-sekvensene.

Oligonukleotider ble laget som en 84mer ved standard metode ved bruk av en ABI gensyntesemaskin. De ble betegnet slik at i den dobbeltkjedede formen har de syntetiske fragmentene restriksjonsendonukleaseseter EcoRI og KpnI ved henholdsvis 5' og 3'-endene. På grunn av deres lengde kunne oligomerene ikke bli rensset ved hjelp av HPLC og rensing ble gjort ved hjelp av akrylamidgel-elektroforese ved bruk av 10% akrylamid: 7M ureagel.

Før rensingen, ble oligomerene først undersøkt på en størrelses-separeringsgel for å forsikre at de ikke bare var av korrekt størrelse, men at også prøvene som var laget inneholdt som største del de oligomerene som var ønsket og ikke i høy grad var forurenset av mindre sekundære oligonukleotider som er side-produkter av syntesen.

Polyakrylamidgelene ble laget under standard fremgangsmåter med ammoniumpersulfat og N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin benyttet som katalysatorer for gelpolymerisering.

For størrelsemåling av oligonukleotidene krevet dette at de kunne bli synliggjort etter elektroforese. Det var derfor nødvendig å merke prøvene radioaktivt ved bruk av ³²P. Dette

gjorde det mulig å vurdere prøve kvalitet etter elektroforese ved hjelp av autoradiografi.

Oligonukleotidprøver ble gitt i uren og ikke-fosforylert form. Dette ble benyttet for radioaktivt merkningsformål ved at prøvene kunne bli "varmt" merket i 5'-endene ved fosforylering ved bruk av enzymet T4 polynukleotidkinase.

Oligomerer ble oppnådd ved syntese av ikke-fosforylert form og etter rensning ble hver oligomer enkeltvis gjenstand for fosforyleringsreaksjon der ATP ble benyttet for å fosforylere 5'-enden av molekylet i nærvær av T4 polynukleotidkinase. (Se Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2. utg. Sambrook, Fritsch og Maniatis, s. 5.68-5.71). Når de var fosforylert ble de to komplementære oligonukleotidene bundet sammen til å danne dobbelt-kjedet DNA-dupleksen som inneholdt T7A3-promotoren og RBS1-sekvensen.

Vektormolekylet pCG54 ble spaltet med restriksjonsenzymene EcoRI og KpnI. Ved restriksjonsspaltning blir et 2,3kb vektorfragment og et 1,1kb fragment som inneholdt λ_{pL} -promotoren og RBS1-sekvensen laget. Dette kloningstrinnet er planlagt og erstatte λ_{pL} -RBS1-sekvensen ved EcoRI til KpnI syntetisk fragment som omfatter T7A3-RBS1-sekvensen. Det 2,3kb vektorfragment som resulterte fra spaltning av pCG54 ble rensset ved hjelp av vanlig fremgangsmåte ved bruk av agarosegel-elektroforese og Geneclean-fremgangsmåte for å fjerne DNA fra agarosefragmentene.

Det 84bp EcoRI-KpnI syntetiske fragment ble koblet inn i vektormolekylet som var laget ovenfor og det koblete DNA benyttet til å transformere E.coli HB101-celler. Seleksjon av positive rekombinante kloner ble utført ved hjelp av ampicillin-resistens. Etter transformasjon ble et antall kolonier som inneholdt rekombinant plasmid valgt for videre undersøkelser.

Det syntetiske fragment som var satt inn i vektoren under kloningen var av størrelse (84 mer) slik at restriksjonsanalyse av rekombinant plasmid DNA-prøver ikke var tilstrekkelig som en enkel undersøkelsesmetode. Innskudd med en slik liten størrelse er ikke lett synlig på agarosegel-elektroforese. Fragmentet selv inneholder intet internt restriksjonsendonuklease-spaltningssete som kunne være av diagnostisk nytte. Den første

undersøkelse av rekombinante kloner ble derfor utført ved hjelp av fremgangsmåten for kolonihybridisering (se Grunstein og Hogness Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3961 (1975)). Nitrocellulose-filtre som inneholdt immobilisert plasmid-DNA fra de rekombinante klonene ble hybridisert mot en "probe" som var laget ved vilkårlig radioaktiv merking av det syntetisk sammensatte oligonukleotid SEQ ID nr. 57 og SEQ ID nr. 58. DNA ble merket ved bruk av $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP og inkubert med Klenow polymerase ved 37°C i 2 timer. Rekombinante kolonier som ga en positiv hybridiseringsreaksjon ble valgt for plasmid DNA-tillagning. Plasmid DNA ble laget i hvert tilfelle ved hjelp av en relativt storskala-metode som omfattet CsCl-gradient-tetthet-sentrifugering for å sikre renhet, se "Molecular Cloning - A laboratory manual", 2. utg., Sambrook, Fritsch og Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) s. 1.42-1.52. Tillagning av DNA ved hjelp av en slik metode sikrer høy kvalitetforbindelse som er passende for bruk i etterfølgende kloningsarbeid og sekvens-analyse.

All plasmid-DNA som ble isolert fra rekombinante kloner ble inkludert i en sekundær undersøkelse ved hjelp av sekvens-analyse, for å sikre at oligonukleotidsekvensen ved klonings-overgangen og at T7A3-RBS1-fragmentet selv var helt korrekt. Sekvenseringsprotokollen som ble benyttet var den til Sequenase og sekvenserings-"primer" valgt for bruk var f.eks. pBR322 UP (pBR322 universell "primer"). Sekvensering ble utført ved bruk av Sanger dideoxy-kjedeavslutnings-sekvenseringsfremgangsmåten. Kloner som hadde den korrekte sekvensen ble betegnet som den nye ekspresjonskonstruksjonen pCG61, og inneholdt T7A3-promotoren, RBS1-sekvensen og T4-terminatorsekvensen (se fig. 10).

c) Produksjon av pCG300 (også omtalt som pICI 1295) fra pCG61

Sekvensen og syntesetrinnene involvert i tillagningen av G-CSF-analogen $[\text{Ser}^{17,27}]_{\text{hu}}$ G-CSF er beskrevet i Eks. 1 (se fig. 3). Denne G-CSF-analogsekvens ble isolert fra en konstruksjon hvor genet hadde vært innsatt i plasmidet pSTP1 til å gi pICI1107 (se Eks. 2). pICI1107 ble spaltet med ScaI og det store fragmentet isolert etter agarosegel-elektroforese og

Geneclean-opprensning. Dette fragment ble så spaltet med restriksjonsendonuklease SallI for å gi et [Ser^{17,27}]hu G-CSF-gen på et ScaI til SallI restriksjonsfragment som var passende for kloning i pCG61 (se fig. 10).

Etter restriksjon med SallI ble det ønskede fragment isolert ved bruk av agarosegel-rensningsfremgangsmåter én gang til.

Vektormolekylet pCG61 ble spaltet med restriksjonsenzym KpnI. Spalting med dette enzym laget et 3'-overheng som så ble gjort like-endet ved bruk av enzymet T4-polymerase, se "Molecular Cloning - a Laboratory manual", 2. utg., Sambrook, Fritsch og Maniatis, s. 5.44 - 5.47. T4-polymeraseaktivitet ble varmeinaktivert ved inkubering ved 70°C i 30 min. og DNA gjenvunnet ved etanol-utfelling. Bunnfallet ble løst i sterilt destillert vann og det oppløste DNA spaltet med SallI. KpnI (nå like-endet) til SallI-vektorfragmentet ble gjenvunnet ved hjelp av etanol-utfelling etterfulgt av agarosegel-elektroforese og opprensningsmetoder.

ScaI til SallI [Ser^{17,27}]hu G-CSF-fragmentet ble så koblet til den like-endede KpnI til SallI-vektoren. Koblet DNA ble transformert inn i E. coli-stamme HB101. Seleksjon av rekombinante kloner benyttet ampicillinresistens.

Den første undersøkelse av potensielle rekombinante kloner var ved hjelp av hybridisering. En radioaktivt merket probe ble laget ved tilfeldig merking av et EcoRI til SallI-fragment (som inneholdt [Ser^{17,27}]hu G-CSF-gensekvensen) laget fra plasmidet pICI1107. Dette ble benyttet i hybridisering mot kolonier hvis DNA hadde blitt immobilisert på overflaten til nitrocellulosefiltere. Deretter ble plasmid-DNA laget fra 24 kloner som var blitt hybridisert i denne undersøkelse. Alle DNA-preparatene ble laget ved hjelp av den hurtige mini-prep-fremgangsmåten, se Birnboim and Doly, Nucleic Acids Research, 7, 1513, 1979. Disse rekombinante DNA-preparater ble gjenstand for en sekundær undersøkelse ved hjelp av restriksjonsanalyse. Linearisering av DNA med BamHI som er et unikt sete i ekspressjonskassetten, viser nærværet av [Ser^{17,27}]hu G-CSF-sekvensen.

Sekvensanalyse ble utført for å bekrefte nærværet av [Ser^{17,27}]hu G-CSF-genet og til å bekrefte at basesekvensen ved kloningsovergangene og gjennom [Ser^{17,27}]hu G-CSF-genet var

korrekt. For dette formål ble storskala-plasmid-DNA-prøver laget fra 16 rekombinante kloner ved bruk av CsCl-gradient-tetthets-sentrifugeringsfremgangsmåte for å sikre renhet. Sekvenseringstrinn ble utført i henhold til sekv nsprotokollen og den valgte sekvenserings-"primer" var pBR322-universal-"primeren" (EcoRI). To av de rekombinante klonene inneholdt den korrekte sekvensen ved ScaI-enden til [Ser^{17,27}]hu G-CSF-fragmentet og gjennom G-CSF-peptidsekvensen selv. Klonene ble identifisert som ekspresjonskonstruksjon pCG300 (se fig. 12).

SEQ ID nr. 1

SEKVENSLENGDE: 62 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG

TCT TTC CTG CTG AAG TGT CTC

62

SEQ ID nr. 2

SEKVENSLENGDE: 64 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CTG TTC GAG ACA CTT CAG CAG GAA AGA CTG CGG CAG AGA

GCT TGC TGG ACC CAG TGG AGT ACTG

64

SEQ ID nr. 3

SEKVENSLENGDE: 60 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC GAT GGT GCG CGT CTG

CAG GAA AAG CTG TGC GCA ACC

60

SEQ ID nr. 4

SEKVENSLENGDE: 60 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

TTT GTA GGT TGC GCA CAG CTT TTC CTG CAG AGC CGC ACC
ATC GCC TTG AAT TTT ACG TAC

60

SEQ ID nr. 5

SEKVENSLÆNGDE: 48 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA CTG GTG CTG CTC GGT
CAC TCT CTG

48

SEQ ID nr. 6

SEKVENSLÆNGDE: 51 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CGG GAT CCC CAG AGA GTG ACC GAG CAG CAC CAG TTC CTC
AGG GTG GCA CAG

51

SEQ ID nr. 7

SEKVENSLÆNGDE: 63 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GGG ATC CCG TGG GCT CCA CTG AGC TCT TGC CCG TCC CAA
GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG

63

SEQ ID nr. 8

SEKVENSLÆNGDE: 60 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CTG GCT CAA GCA GCC TGC CAG TTG TAA AGC TTG GGA CGG
GCA AGA GCT CAG TGG AGC CCA

60

SEQ ID nr. 9

SEKVENSLÆNGDE: 63 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

AGC CAG CTG CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG
CTG CAG GCT CTA GAA GGC ATC TCT

63

SEQ ID nr. 10

SEKVENSLÆNGDE: 63 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

TTC AGG AGA GAT GCC TTC TAG AGC CTG CAG CAG ACC CTG
GTA CAG GAA CAG ACC GGA GTG CAG

63

SEQ ID nr. 11

SEKVENSLÆNGDE: 60 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CCT GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC
GTT GCC GAC TTC GCT ACT ACC

60

SEQ ID nr. 12

SEKVENSLÆNGDE: 63 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

TTG CCA TAT GGT AGT AGC GAA GTC GGC AAC GTC CAG CTG
CAG TGT GTC CAG GGT GGG CCC CAA

63

SEQ ID nr. 13

SEKVENSLÆNGDE: 63 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

ATA TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG GCT CCG GCA
CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG

63

SEQ ID nr. 14

SEKVENSLÆNGDE: 60 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

TGC TGG CAT CGC ACC CTG AGT CGG CTG CAG TGC CGG AGC

CAT ACC CAG TTC CTC CAT CTG

60

SEQ ID nr. 15

SEKVENSLÆNGDE: 60 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CCA GCA TTC GCC TCT GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT

GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT

60

SEQ ID nr. 16

SEKVENSLÆNGDE: 60 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GCT CTG AAG ATG GGA GGC AAC CAG AAC ACC GCC TGC GCG

CCG CTG GAA AGC AGA GGC GAA

60

SEQ ID nr. 17

SEKVENSLÆNGDE: 55 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CAG AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC

CTG GCC CAG CCG TTAG

55

SEQ ID nr. 18

SEKVENSLÆNGDE: 53 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

TCGACTTA CGG CTG GGC CAG GTG ACG CAG AAC GCG GTA AGA

CAC CTC GAG GAA

53

SEQ ID nr. 19

SEKVENSLENGDE: 21 baser
SEKVENSType: nukleotid
KJEDE: enkel
TOPOLOGI: lineær
TACAACTGGCAGGCTGCTTGA

21

SEQ ID nr. 20

SEKVENSLENGDE: 21 baser
SEKVENSType: nukleotid
KJEDE: enkel
TOPOLOGI: lineær
GACGTTGCCGACTTCGCTACT

21

SEQ ID nr. 21

SEKVENSLENGDE: 21 baser
SEKVENSType: nukleotid
KJEDE: enkel
TOPOLOGI: lineær
TGCCGGAGCCATACCCAGTTC

21

SEQ ID nr. 22

SEKVENSLENGDE: 21 baser
SEKVENSType: nukleotid
KJEDE: enkel
TOPOLOGI: lineær
GCCTGCCAGTTGTAAAGCTTG

21

SEQ ID nr. 23

SEKVENSLENGDE: 26 baser
SEKVENSType: nukleotid
KJEDE: enkel
TOPOLOGI: lineær
GCACCATCGCCTTGAATTTTACGTAG

26

SEQ ID nr. 24

SEKVENSLENGDE: 62 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG
CAG TCT TTC CTG CTG AAG TCT CTC

62

SEQ ID nr. 25

SEKVENSLENGDE: 64 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CTG TTC GAG AGA CTT CAG CAG GAA AGA CTG CGG CAG
AGA GCT TGC TGG ACC CAG TGG AGT ACTG

64

SEQ ID nr. 26

SEKVENSLENGDE: 60 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC AGC GGT GCG GCT
CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA ACC

60

SEQ ID nr. 27

SEKVENSLENGDE: 60 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

TTT GTA GGT TGC GCA CAG CTT TTC CTG CAG AGC CGC
ACC GCT GCC TTG AAT TTT ACG TAC

60

SEQ ID nr. 28

SEKVENSLENGDE: 29 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CTT CAG CAG GAA AGA ACG CGG CAG AGA GC

29

SEQ ID nr. 29

SEKVENSLÆNGDE: 33 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GC TTG GGA AGA GCA AGA GCT CAG AGA AGC CCA C 33

SEQ ID nr. 30

SEKVENSLÆNGDE: 40 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CTG TTG CCA TAT GCT AGA AGC GAA GTC TTC AAC GTC CAG C 40

SEQ ID nr. 31

SEKVENSLÆNGDE: 27 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GCT CAG TGG AGC TTT CGG GAT CCC CAG 27

SEQ ID nr. 32

SEKVENSLÆNGDE: 27 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

ACG CAG AAC GCG GCG AGA CAC CTC GAG 27

SEQ ID nr. 33

SEKVENSLÆNGDE: 29 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

G TTC GAG AGA CTT TTC CAG GAA AGA CTG C 29

SEQ ID nr. 34

SEKVENSLENGDE: 33 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

C CTG CAG TTT CGC AGC GCT AGC TTG AAT TTT AC

33

SEQ ID nr. 35

SEKVENSLENGDE: 37 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CAG AGA GTG AGC GAG CTT CAC CAG TTC CTC AGC GTG G

37

SEQ ID nr. 36

SEKVENSLENGDE: 29 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GCT CAG TGG AGC TTT CGG GAT AGC CAG AG

29

SEQ ID nr. 37

SEKVENSLENGDE: 30 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CAG CTT TTC CTG CAG ACG CGC AGC GCT AGC

30

SEQ ID nr. 38

SEKVENSLENGDE: 29 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CC GCT GCC TTG AAT ACG ACG TAC CTG TTC

29

SEQ ID nr. 39

SEKVENSLÆNGDE: 30 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GGT TGC GCA CAG ACG TTC CTG CAG AGC CGC

30

SEQ ID nr. 40

SEKVENSLÆNGDE: 29 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

G GTG GCA CAG ACG GTA GGT TGC GCA CAG C

29

SEQ ID nr. 41

SEKVENSLÆNGDE: 45 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CG CGG CAG AGA GCT TGC ACG GTA GGT TGG AGC CAT TGTCGATACC 45

SEQ ID nr. 42

SEKVENSLÆNGDE: 24 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GCA AGA GCT CAG AGA AGC CCA CGG

24

SEQ ID nr. 43

SEKVENSLÆNGDE: 39 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CA GCC TGC CAG TTG TAA AGC TTG GGA GCT GCA AGA GCT C

39

SEQ ID nr. 44

SEKVENSLENGDE: 27 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GCT CAG AGA AGC TTT CGG GAT CCC CAG

27

SEQ ID nr. 45

SEKVENSLENGDE: 46 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

CGG GAT AGC CAG AGA GTG AGC GAG TTT CAC CAG TTC

CTC AGC GTG G

46

SEQ ID nr. 46

SEKVENSLENGDE: 174/177 aminosyrer

SEKVENSTYPE: aminosyre

TOPOLOGI: lineær

Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln
1				5					10	
Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Val	Arg
			15					20		
Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Glu
		25					30			
Lys	Leu	(Val	Ser	Glu)	m	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys
	35									40
Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	His
			45					50		
Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser
		55					60			
Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys
	65					70				
Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr
75					80					85
Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser
				90					95	

Pro	Glu	Leu	Gly 100	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr 105	Leu	Gln
Leu	Asp	Val 110	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr 115	Thr	Ile	Trp
Gln	Gln 120	Met	Glu	Glu	Leu	Gly 125	Met	Ala	Pro	Ala
Leu 130	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly 135	Ala	Met	Pro	Ala	Phe 140
Ala	Ser	Ala	Phe 145	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly 150	Val
Leu	Val	Ala	Ser 155	His	Leu	Gln	Ser	Phe 160	Leu	Glu
Val	Ser	Tyr 165	Arg	Val	Leu	Arg	His 170	Leu	Ala	Gln

Pro

(hvor m er 0 eller 1).

SEQ ID nr. 47

SEKVENSLÆNGDE: 168 + 166 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: dobbelt

TOPOLOGI: lineær

AATTCTGGCA	AATATTCTGA	AATGAGCTGT	TGACAATTAA	TCATCGAACT	50
GACCGT	TTATAAGACT	TTACTCGACA	ACTGTTAATT	AGTAGCTTGA	46
AGTTAACTAG	TACGCAAGTT	CACGTAAAAA	GGGTATCGAC		90
TCAATTGATC	ATGCGTTCAA	GTGCATTTTT	CCCATAGCTG		86
AATGGTACCC	GGGGATCCTC	TAGAGTCGAC	CTGCAGGCAT	GCAAGCTTAG	140
TTACCATGGG	CCCCTAGGAG	ATCTCAGCTG	GACGTCCGTA	CGTTCGAATC	136
CCCGCCTAAT	GAGCGGGCTT	TTTTTTAT			168
GGGCGGATTA	CTCGCCCGAA	AAAAAATAGC			166

SEQ ID nr. 48

SEKVENSLÆNGDE: 534 baser

SEKVENSType: nukleotid med tilsvarende protein

KJEDE: dobbelt

TOPOLOGI: lineær

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG	50
Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu	
1 5 10	
CTG AAG TGT CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC GAT GGT GGG GCT	98
Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala	
15 20 25 30	
CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA	146
Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu	
35 40 45	
CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG TGG GCT CCA CTG AGC	194
Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser	
50 55 60	
TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG CTG	242
Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu	
65 70 75	
CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC	290
His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly	
80 85 90	
ATC TCT CCT GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT	338
Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val	
95 100 105 110	
GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG	386
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met	
115 120 125	

GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG CCA GCA TTC GCC TCT 434
 Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser
 130 135 140

GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT CAG 482
 Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln
 145 145 155

AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG 530
 Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
 160 165 170 174

TAA G 534

SEQ ID nr. 49

SEKVENSLÆNGDE: 534 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid med tilsvarende protein

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

AATTCAGT ACT CCA CTG GGT CCA GCA AGC TCT CTG CCG CAG TCT TTC CTG 50
 Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu
 1 5 10

CTG AAG TCT CTC GAA CAG GTA CGT AAA ATT CAA GGC AGC GGT GCG GCT 98
 Leu Lys Ser Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Ser Gly Ala Ala
 15 20 25 30

CTG CAG GAA AAG CTG TGC GCA ACC TAC AAA CTG TGC CAC CCT GAG GAA 146
 Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu
 35 40 45

CTG GTG CTG CTC GGT CAC TCT CTG GGG ATC CCG TGG GCT CCA CTG AGC	194
Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser	
50 55 60	
TCT TGC CCG TCC CAA GCT TTA CAA CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAG CTG	242
Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu	
65 70 75	
CAC TCC GGT CTG TTC CTG TAC CAG GGT CTG CTG CAG GCT CTA GAA GGC	290
His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly	
80 85 90	
ATC TCT CCT GAA TTG GGG CCC ACC CTG GAC ACA CTG CAG CTG GAC GTT	338
Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val	
95 100 105 110	
GCC GAC TTC GCT ACT ACC ATA TGG CAA CAG ATG GAG GAA CTG GGT ATG	386
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met	
115 120 125	
GCT CCG GCA CTG CAG CCG ACT CAG GGT GCG ATG CCA GCA TTC GCC TCT	434
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser	
130 135 140	
GCT TTC CAG CGG CGC GCA GGC GGT GTT CTG GTT GCC TCC CAT CTT CAG	482
Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln	
145 145 155	
AGC TTC CTC GAG GTG TCT TAC CGC GTT CTG CGT CAC CTG GCC CAG CCG	530
Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro	
160 165 170 174	
TAA G	534

SEQ ID nr. 50

SEKVENSLENGDE: 81 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

GAATTCAACA AAACGGTTGA CAACATGAAG TAAACACGGT ACGATGTACC 50

ACAAGTTCAC GTAAAAAGGG TATCGACAATG 81

SEQ ID nr. 51

SEKVENSLENGDE: 67 + 67 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: dobbelt

TOPOLOGI: lineær

TCGACATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCCTTTTTTA TTTTAAAAAG 60

GTAATA TAATGATTAA TTAACCCCTG GGATCTCCAG GGGAAAAAAT AAAATTTTTC 56

CATGCCA 67

GTACGCTTCGA 67

SEQ ID nr. 52

SEKVENSLENGDE: 72 + 72 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: dobbelt

TOPOLOGI: lineær

TCGACATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCCTTTTTTA TTTTAAAAAG 60

GTAATA TAATGATTAA TTAACCCCTG GGATCTCCAG GGGAAAAAAT AAAATTTTTC 56

CATGCGGATC CC 72

GTACGCCTAG GGGAAC 72

SEQ ID nr. 53

SEKVENSLÆNGDE: 118 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: enkel

TOPOLOGI: lineær

AATTCTGGCA AATATTCTGA AATGAGCTGT TGACAATTAA TCATCGAACT 50
AGTTAACTAG TACGCAGAGC TCAATCTAGA GGGTATTAAT AATGTTCCCA 100
TTGGAGGATG ATTAAATG 118

SEQ ID nr. 54

SEKVENSLÆNGDE: 35 + 35 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: dobbelt

TOPOLOGI: lineær

AGCTCCATAT GGTACCAGAT CTCTCGAGAG TACTT 35
GGTATA CCATGGTCTA GAGAGCTCTC ATGAAGATC 35

SEQ ID nr. 55

SEKVENSLÆNGDE: 23 + 15 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: dobbelt

TOPOLOGI: lineær

AGCTCAGCTG CAGCATATGG TAC 23
GTCGAC GTCGTATAC 15

SEQ ID nr. 56

SEKVENSLÆNGDE: 72 + 72 baser

SEKVENSTYPE: nukleotid

KJEDE: dobbelt

TOPOLOGI: lineær

TCGACATTAT ATTACTAATT AATTGGGGAC CCTAGAGGTC CCCTTTTTTA TTTTAAAAAG 60
GTAATA TAATGATTAA TTAACCCCTG GGATCTCCAG GGGAAAAAAT AAAATTTTTC 56

CATGCGGATC CC 72
GTACGCCTAG GGGAAC 72

SEQ ID nr. 57

SEKVENSLÆNGDE: 84 baser
 SEKVENSTYPE: nukleotid
 KJEDE: enkel
 TOPOLOGI: lineær

AAT TCA ACA AAA CGG TTG AGA AGA TGA AGT AAA CAC GGT ACG ATG 45
 TAC CAC AAG TTC ACG TAA AAA GGG TAT CGA CAA TGG TAC 84

SEQ ID nr. 58

SEKVENSLÆNGDE: 76 baser
 SEKVENSTYPE: nukleotid
 KJEDE: enkel
 TOPOLOGI: lineær

CAT TGT CGA TAC CCT TTT TAC GTG AAC TTG TGG TAC ATC GTA CCG 45
 TGT TTA CTT CAT GTT GTC AAC AAC CGT TTT GTT G 76

SEQ ID nr. 59

SEKVENSLÆNGDE: 24 + 24 baser
 SEKVENSTYPE: nukleotid
 KJEDE: dobbelt
 TOPOLOGI: lineær

AATTCGCATG CGGATCCATC GATC 24
 GCGTAC GCCTAGGTAG CTAGAGCC 24

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et derivat av naturlig forekommende G-CSF som har minst én av de biologiske egenskapene til naturlig forekommende G-CSF og en løsningsstabilitet (som herved definert) på minst 35% ved 5 mg/ml, nevnte forbindelse har minst Cys¹⁷ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser¹⁷-rest, og Asp²⁷ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser²⁷-rest, k a r a k t e r i s e r t v e d dyrking av en prokaryot eller eukaryot verticelle som er stabilt transformert eller transfektert med en rekombinant vektor som inneholder en DNA-sekvens som koder for en del av, eller hele aminosyresekvensen til et derivat (forbindelse) som definert ovenfor.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d fremstilling av en forbindelse som definert i krav 1 som har minst én ytterligere modifikasjon som er valgt fra:

- a) Leu¹⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Glu¹⁵-rest;
- b) Lys²³ i den naturlige sekvensen erstattet av en Arg²³-rest;
- c) Gly²⁶ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala²⁶-rest;
- d) Gly²⁸ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala²⁸-rest;
- e) Ala³⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av en Lys³⁰- eller Arg³⁰-rest;
- f) Lys³⁴ i den naturlige sekvensen erstattet av en Arg³⁴-rest;
- g) Lys⁴⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av en Arg⁴⁰-rest;
- h) Pro⁴⁴ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala⁴⁴-rest;
- i) Leu⁴⁹ i den naturlige sekvensen erstattet av en Lys⁴⁹-rest;
- j) Gly⁵¹ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala⁵¹-rest;
- k) Gly⁵⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ala⁵⁵-rest;
- l) Trp⁵⁸ i den naturlige sekvensen erstattet av en Lys⁵⁸-rest;
- m) Pro⁶⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser⁶⁰-rest;
- n) Pro⁶⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser⁶⁵-rest;
- o) Pro¹¹¹ i den naturlige sekvensen erstattet av en Glu¹¹¹-rest;
- p) Thr¹¹⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser¹¹⁵-rest;

- q) Thr¹¹⁶ i den naturlige sekvensen erstattet av en Ser¹¹⁶-rest; og
- r) Tyr¹⁶⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av en Arg¹⁶⁵-rest.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d fremstilling av forbindelser hvor den videre modifikasjon er minst én av følgende:

- a) Gln¹¹, Pro^{60,65} i den naturlige sekvensen erstattet av Arg¹¹, Ser^{60,65};
- b) Ala¹¹¹, Thr^{115,116} i den naturlige sekvensen erstattet av Glu¹¹¹, Ser^{115,116};
- c) Gln¹¹, Trp⁵⁸, Tyr¹⁶⁵ i den naturlige sekvensen er erstattet av Arg^{11,165}, Lys⁵⁸;
- d) Leu¹⁵, Gly^{26,28}, Ala³⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av Glu¹⁵, Ala^{26,28}, Lys³⁰;
- e) Pro⁴⁴, Leu⁴⁹, Gly^{51,55}, Trp⁵⁸ i den naturlige sekvensen erstattet av Lys^{49,58}, Ala^{44,51,55};
Leu¹⁵, Gly^{26,28}, Ala³⁰ i den naturlige sekvensen erstattet av Glu¹⁵, Ala^{26,28}, Arg³⁰;
Pro⁶⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av Ser⁶⁵;
Pro^{60,65} i den naturlige sekvensen erstattet av Ser^{60,65};
eller
Glu¹¹, Pro⁶⁵ i den naturlige sekvensen erstattet av Arg¹¹, Ser⁶⁵.

4. Fremgangsmåte ifølge ett av de foregående krav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det fremstilles en forbindelse valgt fra:

[Arg¹¹, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF;
[Glu¹⁵, Ser^{17,27}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]hu G-CSF;
{Arg¹¹, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28}, Lys³⁰}hu G-CSF;
[Arg^{11,165}, Glu¹⁵, Ser^{17,27,60,65}, Ala^{26,28}, Lys^{30,58}]hu G-CSF;
[Arg^{11,23}, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF;
[Arg^{11,40}, Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF;
[Glu^{15,111}, Ser^{17,27,60,65,115,116}, Ala^{26,28}, Lys³⁰]-

hu G-CSF;
 [Ala¹,Thr³,Tyr⁴,Arg⁵,11,Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF;
 [Arg¹¹,Ser^{17,27,65}]hu G-CSF;
 [Ser^{17,27,65}]hu G-CSF;
 [Ser^{17,27,60,65}]hu G-CSF;
 [Glu¹⁵,Ser^{17,27},Ala^{26,28},Arg³⁰]hu G-CSF;

nevnte forbindelse, har hvis ønskelig metionin som presekvens.

5. Fremgangsmåte for å ekstrahere en forbindelse som definert i ett av kravene 1-4 fra et inklusjonslegeme, karakterisert ved

- 1) oppløsning av nevnte inklusjonslegeme i detergens,
- 2) oksydasjon,
- 3) fjerning av detergens og
- 4) å opprettholde løsningen som er oppnådd etter fjerning av detergens ved en øket temperatur og derved utfelle forurensende bakterieprotein, produktoligomerer og/eller degraderingsprodukter, mens nevnte forbindelse beholdes i løsning i aktiv tilstand.

6. Fremgangsmåte som definert i krav 5, karakterisert ved at forbindelsen som skal ekstraheres har en løsningsstabilitet på minst 85% ved 10 mg/ml.

7. DNA-sekvens, karakterisert ved at den koder for en del av, eller hele aminosyresekvensen til en forbindelse som definert i ett av kravene 1 - 4.

8. Rekombinant vektor, karakterisert ved at den inneholder DNA-sekvens som definert i krav 7.

9. Fremgangsmåte ved fremstilling av en rekombinant vektor som definert i krav 8 som er karakterisert ved innsetting av en DNA-sekvens i en vektor som definert i krav 7.

10. Prokaryot eller eukaryot vertcelle som er stabilt transformert eller transfektert med en rekombinant vektor som definert i krav 8.

11. Fremgangsmåte ved fremstilling av en prokaryot eller eukaryot vert celle som definert i krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d transformasjon eller transfeksjon av en prokaryot eller eukaryot celle med en rekombinant vektor som definert i krav 8 for å gi en stabilt transformert eller transfektert prokaryot eller eukaryot vert.

S a m m e n d r a g

Forbindelser av naturlig forekommende G-CSF som har minst én av de biologiske egenskapene til naturlig forekommende G-CSF, og en løsningsstabilitet på minst 35% ved 5 mg/ml er beskrevet der forbindelsen har minst Cys¹⁷ i den naturlige sekvensen erstattet med en Ser¹⁷-rest og Asp²⁷ i den naturlige sekvensen erstattet med en Ser²⁷-rest

Nukleotidsekvensene som koder for hele eller deler av aminosyresekvensen til forbindelsene i oppfinnelsen kan bli innsatt i et autonomt replikerende plasmid eller virusvektorer som benyttes for å transformere eller transfektere passende prokaryote eller eukaryote vertceller slik som bakterier, gjær eller vertebrat-celler i kultur.

